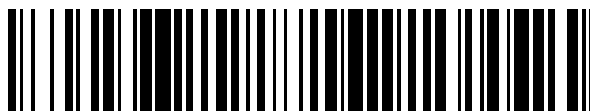


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 148**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2012** E 16190036 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** EP 3141907

54 Título: **Kit de reactivos para detectar anticoagulante lúpico y método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico**

30 Prioridad:

28.02.2011 JP 2011042407

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.04.2019

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1 Wakinohama-Kaigandori 1-chome Chuo-ku
Kobe-shiHyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**OKUDA, MASAHIRO;
YOSHIDA, KAZUYO y
KUMANO, OSAMU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 709 148 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Kit de reactivos para detectar anticoagulante lúpico y método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico, que es uno de los anticuerpos responsables del síndrome antifosfolípido y se refiere adicionalmente a un método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico en un espécimen obtenido de un sujeto.

Antecedentes

El síndrome antifosfolípido (en adelante en el presente documento denominado "SAF") es un término general para un grupo de enfermedades que tienen anticuerpos antifosfolípidos en la sangre y presentan síntomas clínicos tales como trombosis arteriovenosa y aborto habitual (véase Mika Yoshida et al., *The Japanese Society for Laboratory Hematology*, 2008, 9(1):69-76). Los anticuerpos antifosfolípidos (en adelante en el presente documento denominados "aFL") es un término general para los autoanticuerpos que se unen a fosfolípidos o a un complejo de fosfolípidos y proteínas (véase, Tatsuya Atsumi et al., *The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis*, 2008, 19(3):329-332).

Hay varios anticuerpos aFL y el nombre de anticuerpos se da de acuerdo con fosfolípidos reconocidos por los anticuerpos o proteínas de unión a fosfolípidos. Entre los ejemplos de los anticuerpos aFL se incluyen anticuerpos anti-cardiolipina (aCL), anticuerpos anti- β 2 glicoproteína I ($\alpha\beta$ 2GPI), anticuerpos anti-protrombina dependientes de fosfatidilserina (aPS/PT) y anticoagulante lúpico (en adelante en el presente documento, también denominado "AL"). aCL, $\alpha\beta$ 2GPI, y aPS/PT se detectan mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) y LA se detecta mediante la prolongación del tiempo de coagulación dependientes de fosfolípidos (véase Masahiro Ieko et al., *The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis*, 2007, 18(3):226-233).

El AL se define como "una inmunoglobulina que inhibe las reacciones de coagulación de la sangre dependientes de fosfolípidos sin inhibir las actividades del factor de coagulación individual. También se considera que el AL es un autoanticuerpo que inhibe los propios fosfolípidos en las reacciones de coagulación de la sangre dependientes de fosfolípidos.

Actualmente, la norma para la inspección del AL es la siguiente:

- 1) Se observa prolongación del tiempo de coagulación en la inspección de detección selectiva para la medición de los tiempos de coagulación dependientes de fosfolípidos, tales como el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), el tiempo con veneno de víbora de Russel diluido (dRVVT) y el tiempo de coagulación con caolín (KCT);
- 2) La prolongación del tiempo de coagulación no mejora incluso si se lleva a cabo un ensayo de mezcla con plasma de donantes sanos;
- 3) se confirma que el tiempo de coagulación se acorta añadiendo un exceso de fosfolípidos (ensayo para evaluar la dependencia de fosfolípidos).

Finalmente, se diagnostica a un sujeto que es positivo para AL excluyendo las anomalías de coagulación obvias, tales como por inhibidores de los factores de coagulación y la influencia de anticoagulantes tales como heparina (véase, Mika Yoshida et al., *Journal of the Japanese Society for Laboratory Hematology*, 2008, 9(1):69-76).

Uno de los ensayos para evaluar la dependencia del AL de los fosfolípidos es un método para evaluar la presencia de AL en un espécimen, que incluye las etapas de: medir el tiempo de coagulación utilizando un reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una baja concentración de fosfolípidos y un reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una concentración alta de fosfolípidos; y confirmar la prolongación del tiempo de coagulación en función de la concentración de fosfolípidos basándose en la relación de los tiempos de coagulación que se obtienen con los reactivos.

Exner et al. (1975 *Pathology* 7(4): 319-328) divulga reactivos de medición de tiempo de coagulación que comprenden caolín y diferentes concentraciones de sal de metal alcalino, en particular NaCl, con o sin fosfolípidos. Exner et al. también divulga reactivos que comprenden una cierta cantidad de NaCl y diferentes concentraciones de fosfolípidos. Exner et al. no divulga reactivos de medición de tiempo de coagulación que comprenden diferentes concentraciones de fosfolípidos y diferentes concentraciones de sal de metal alcalino.

Schjetlein et al. (1993 *Thrombosis Research* 72(4), 287-294) divulga reactivos de medición de tiempo de coagulación (LR-APTT) que comprenden ácido eláxico y fosfolípidos, en particular cefalina cruda, diluida 1:50 y 1:800 en solución salina almacenada. Las concentraciones de la sal de metal alcalino, es decir la solución salina almacenada, y los fosfolípidos en estos reactivos siempre se vinculan inherentemente entre sí en el sentido en que el reactivo que

contiene la concentración más alta de fosfolípidos (es decir, la dilución menor) contendrá la menor concentración de sal de metal alcalino. Schjetlein et al. también divulga un método de determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico usando estos reactivos de medición de tiempo de coagulación.

5 Los presentes inventores han completado un kit de reactivos capaz de detectar el AL con una sensibilidad alta ajustando la composición de fosfolípidos contenida en un reactivo (véanse la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004/0091952, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2005/0175983 y la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) n.º 2006-133002).

10 Aunque el AL se puede detectar mediante los métodos anteriores, la prolongación del tiempo de coagulación se observa incluso si se utiliza el reactivo que contiene una concentración elevada de fosfolípido. Es decir, en el caso de la utilización de los métodos convencionales, incluso una relación del tiempo de coagulación en un espécimen positivo para AL puede ser igual a la de un espécimen negativo. Por lo tanto, es difícil separar claramente un grupo de especímenes positivos para AL de un grupo de especímenes negativos para AL.

15 **Sumario de la invención**

El alcance de la presente invención solo se define con las reivindicaciones adjuntas y no se ve afectado en ninguna medida por las afirmaciones de este sumario.

20 Los presentes inventores han descubierto que la prolongación del tiempo de coagulación por el anticoagulante lúpico (AL) se puede suprimir utilizando un reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sales de metales alcalinos de forma que el grupo de especímenes positivos a AL puede separarse claramente del grupo de especímenes negativos a AL y se ha completado la presente invención.

25 (1) Un primer aspecto de la presente invención es un kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico que comprende:

30 un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación; y
un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación;
donde al menos uno del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene sal de metal alcalino y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene sal de metal alcalino a una concentración inferior a la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene sal de metal alcalino;
35 donde el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípido y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípido a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación; y donde el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen un activador seleccionado del grupo que consiste en ácido elálgico, celite
40 y sílice.

(2) El kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico de acuerdo con (1), donde la sal de metal alcalino es sal de metal alcalino de ácido inorgánico.

45 (3) El kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico de acuerdo con uno cualquiera de (1) o (2), donde la sal de metal alcalino es sal de sodio o sal de potasio.

En realizaciones, el fosfolípido es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

50 (4) El kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), que además comprende un tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sal de calcio.

55 (5) Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un primero y segundo reactivo como se describe para el kit de reactivos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un anticoagulante lúpico en un espécimen, para la identificación de muestras positivas para AL y negativas para AL y/o para el diagnóstico *in vitro* del síndrome antifosfolipídico. Más particularmente, la invención proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico que comprende las etapas de:

60 mezclar un espécimen que se obtiene de un sujeto con el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sal de metal alcalino para medir el primer tiempo de coagulación;
mezclar el espécimen con un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sal de metal alcalino a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o que no contiene una sal de metal alcalino para medir el segundo tiempo de coagulación; donde el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos a una concentración menor que la del primer reactivo de
65

medición del tiempo de coagulación; y
 determinar si el AL está contenido en el espécimen basándose en el primer y el segundo tiempo de coagulación medidos; donde el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen un activador seleccionado del grupo que consiste en ácido eláxico, celite y sílice.

5
 (6) El método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con (5), donde se determina si el anticoagulante lúpico está contenido en el espécimen mediante la comparación de un valor obtenido basándose en la diferencia o la relación entre los tiempos de coagulación primero y segundo con un valor umbral predeterminado en la etapa de determinación, donde dicho valor umbral se determina en base a una relación del tiempo de coagulación del espécimen obtenido del sujeto al tiempo de coagulación del plasma normal.

10
 (7) El método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con uno cualquiera de (5) o (6), donde la sal de metal alcalino es sal de metal alcalino de ácido inorgánico.

15
 (8) El método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con uno cualquiera de (5) a (7), donde la sal de metal alcalino es sal de sodio o sal de potasio.

20
 En realizaciones, el fosfolípido es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

Al hacer uso del kit de reactivos para la detección de AL de la presente invención, la prolongación del tiempo de coagulación del AL se suprime de manera que el grupo de especímenes positivos para AL se puede separar claramente separada del grupo especímenes negativos para AL. De acuerdo con el método de determinación de la presencia o ausencia de AL de la presente invención, se puede determinar con precisión si el AL está contenido en el espécimen que se obtiene del sujeto.

25
 En el presente documento también se describen métodos *in vitro* de diagnóstico del síndrome antifosfolipídico mediante el uso de las herramientas y métodos descritos en el presente documento.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama de dispersión que muestra la distribución de la relación del lupus de especímenes negativas para AL y positivas para AL que se ha calculado a partir del tiempo de coagulación medido usando el kit de reactivos para la detección de AL según una realización de la presente invención, que incluye un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene cloruro de sodio como sal de metal alcalino y un segundo de reactivo de medición del tiempo de coagulación que no contiene sal de metal alcalino;

35
 La figura 2 es un diagrama de dispersión que muestra la distribución de la relación del lupus de especímenes negativas para AL y positivas para AL que se ha calculado a partir del tiempo de coagulación medido usando el kit de reactivos para la detección de AL según una realización de la presente invención, que incluye el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene cloruro de potasio como sal de metal alcalino y el segundo de reactivo de medición del tiempo de coagulación que no contiene sal de metal alcalino; y

40
 La figura 3 es un diagrama de dispersión que muestra la distribución de la relación del lupus de especímenes negativas para AL y positivas para AL que se ha calculado a partir del tiempo de coagulación medido usando el kit de reactivos para la detección de AL según una realización de la presente invención, que incluye el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sal de sodio como sal de metal alcalino y el segundo de reactivo de medición del tiempo de coagulación que no contiene sal de metal alcalino.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

50
 A continuación en el presente documento se describirán las realizaciones preferidas de la presente invención con referencia a las figuras.

El kit de reactivos para detectar el AL de la presente invención incluye un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación y un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación, donde al menos uno del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación y del segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene sal de metal alcalino a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene sal de metal alcalino, donde el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación, y donde el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen un activador seleccionado del grupo que consiste en ácido eláxico, celite y sílice.

60
 La sal de metal alcalino contenida en el primer y opcionalmente en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación del kit de reactivos de la presente invención no está particularmente limitada siempre que genere iones de metal alcalino en un disolvente adecuado, preferentemente tampones incluidos en los reactivos y los aniones generados de la sal de metal alcalino no inhiben una reacción de la coagulación de la sangre. Entre los ejemplos que se pueden usar de sal de metal alcalino se incluyen sales de metales alcalinos de ácidos inorgánicos que son

sales de metales alcalinos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, y ácido nítrico. Particularmente, es preferible utilizar ácidos inorgánicos tales como sales de sodio y sales de potasio. Ejemplos específicos de los mismos incluyen cloruro de sodio, sulfato de sodio, nitrato de sodio, cloruro de potasio, y nitrato de potasio. Particularmente, se prefieren cloruro de sodio, sulfato de sodio, y cloruro de potasio. La sal de metal alcalino puede ser un anhídrido o un hidrato.

La concentración de la sal de metal alcalino en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser de 0,001 a 40 %, preferentemente de 0,01 a 10 %, más preferentemente de 0,1 a 5 %. En realizaciones particulares, la concentración de sal de metal alcalino es de 0,2 a 5 %. En realizaciones particulares adicionales, la concentración de la sal de metal alcalino es de 0,2 a 5 %. El segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación no necesita contener la sal de metal alcalino. Cuando el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene la sal de metal alcalino, la concentración de sal de metal alcalino en el mismo es inferior a la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Por ejemplo, cuando la concentración de la sal de metal alcalino en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es del 1 %, la concentración de la sal de metal alcalino en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación se puede fijar en 0,1 %.

En el kit de reactivos de la presente invención, una relación de la concentración de la sal de metal alcalino en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación con respecto al primer reactivo de medición del tiempo de coagulación [concentración de la sal de metal alcalino del segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación]/[concentración de la sal de metal alcalino del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación] puede ser de 0 a 1, de 0 1 0,1 o, preferentemente, de 0 a 0,2.

En el kit de reactivos de la presente invención, el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos a una concentración menor que la del primer reactivo de medición de la coagulación con el fin de facilitar la coagulación sanguínea.

Los ejemplos de los fosfolípidos incluyen fosfatidiletanolamina (en adelante en el presente documento también denominado PE), fosfatidilcolina (adelante en el presente documento también denominado PC) y fosfatidilserina (adelante en el presente documento también denominado PS). Los primeros y segundo reactivos de medición del tiempo de coagulación pueden contener al menos uno seleccionado de PE, PC y PS, preferentemente dos clases de los mismos, más preferentemente todas las clases de los fosfolípidos.

El fosfolípido contenido en los reactivos de medición del tiempo de coagulación primero y segundo puede ser un fosfolípido de origen natural o un fosfolípido sintético. Entre ellos, el fosfolípido sintético o el fosfolípido de origen natural purificado con una pureza del 99 % o más se prefiere desde el punto de vista de la mejora de la capacidad de detección del AL. Las cadenas laterales de ácidos grasos de PE, PC y PS no están particularmente limitadas y ejemplos de los mismos incluyen ácido palmítico, ácido oleico y ácido esteárico. Entre ellos, es preferente el ácido oleico.

El contenido de fosfolípidos en el primero y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación cuando se mezclan cantidades equivalentes de un espécimen y el primero o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación se mezclan (por ejemplo, se mezclan 50 μ l del espécimen y 50 μ l del primero o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación) y midiendo el tiempo de coagulación puede ser el siguiente. La concentración de fosfolípido en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser de 100 a 2000 μ g/ml, preferentemente de 100 a 600 μ g/ml. La concentración de fosfolípido en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser de 20 a 1000 μ g/ml, preferentemente de 30 a 70 μ g/ml.

Cuando los primeros y segundo reactivos de medición del tiempo de coagulación contienen seleccionado PE, PC y PS como fosfolípidos, la concentración de PE en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser de 30 a 700 μ g/ml, preferentemente de 40 a 300 μ g/ml. La concentración de PC puede ser de 50 a 1.000 μ g/ml, preferentemente de 60 a 500 μ g/ml, y la concentración de PS puede ser de 5 a 300 μ g/ml, preferentemente de 10 a 150 μ g/ml. La concentración de PE en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser de 1 a 100 μ g/ml, preferentemente de 10 a 80 μ g/ml. La concentración de PC puede ser de 5 a 200 μ g/ml, preferentemente de 20 a 150 μ g/ml. La concentración de PS puede ser de 1 a 100 μ g/ml, preferentemente de 3 a 50 μ g/ml.

Cuando una relación de mezcla de un espécimen y el primero o segundo reactivo de medición del tiempo no es 1:1, la concentración final de fosfolípidos en una mezcla del espécimen y el primero o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación se puede ajustar de manera que sea la misma que una mezcla cuando se usan reactivos que tienen las concentraciones de fosfolípidos.

En el kit de reactivo de la presente invención, los primeros y segundos reactivos de medición del tiempo de coagulación pueden contener además otros componentes necesarios para causar la coagulación de la sangre in vitro. Entre los ejemplos de los otros componentes se incluyen veneno de serpiente, un factor tisular y sal de calcio.

Como activador, el ácido eláxico puede estar en un estado donde se forman iones metálicos y quelato. Como veneno de serpiente, preferentemente se usa al menos uno seleccionado del grupo que consiste en veneno de Russel, veneno de textarina y veneno de ecarina.

Como factor tisular, preferentemente se usa uno derivado de cerebro de conejo, derivado de la placenta humana o un recombinante.

- Los otros componentes anteriores se seleccionan adecuadamente en función del método de medición del tiempo de coagulación del espécimen. Por ejemplo, cuando el tiempo de coagulación se mide con en base al principio de un tiempo de tromboplastina parcial activada, el primero y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede contener sal de calcio. Cuando el tiempo de coagulación se mide con en base al principio de un tiempo de veneno de Russel, el primero y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede contener veneno de serpiente y sal de calcio. Cuando el tiempo de coagulación se mide con en base al principio de un tiempo de protrombina, el primero y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede contener un factor tisular y sal de calcio.
- En el kit de reactivos de la presente invención, el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación pueden contener un tampón que tiene una acción tampón en un intervalo de pH de 5 a 10, preferentemente en un intervalo de pH de 6 a 9. Entre los ejemplos del tampón se incluyen ácido 4-(2-hidroximetil)piperazin-1-il-etanosulfónico (HEPES), tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y un tampón fosfato (PBS).
- La concentración de tampón en los reactivos puede estar en el intervalo permitido y usado generalmente en el campo de la química clínica y se determina empíricamente basándose en experimentos simplificados y repetidos.
- El primer reactivo de medición del tiempo de coagulación del kit de reactivos de la presente invención puede ser una mezcla en forma de solución o suspensión que contiene una sal de metal alcalino, el fosfolípido, el activador y/u, opcionalmente, otros componentes en el tampón. Además, el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser una mezcla en forma de solución o suspensión que contiene el fosfolípido, el activador y opcionalmente, otros componentes en el tampón y contiene o no contiene una sal de metal alcalino.
- El kit de reactivos de la presente invención puede contener además un tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de calcio. La sal de calcio no está particularmente limitada siempre que genere iones de calcio (Ca^{2+}) en un disolvente adecuado, preferentemente tampones incluidos en los reactivos. Por ejemplo, se cita el cloruro de calcio. La concentración de la sal de calcio en el tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación no está particularmente limitada siempre que sea una concentración suficiente para el inicio de la coagulación en la mezcla del espécimen y el primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación y es, preferentemente, de 10 a 40 mM.
- El kit de reactivos de la presente invención puede ser una forma combinada del primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación y el tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Es decir, en el kit de reactivos de la presente invención, el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación puede estar comprendido por el primer reactivo parcial que contiene la sal de metal alcalino y el segundo reactivo parcial que contiene sal de calcio. El segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede estar comprendido por el tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene la sal de metal alcalino a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene sal de metal alcalino y un cuarto reactivo parcial que contiene sal de calcio.
- De aquí en adelante en el presente documento se describirá el método de determinación de la presencia o ausencia de AL en un espécimen (al que también se hace referencia como método de la presente invención). En el método de la presente invención, el kit de reactivos para detectar AL de la presente invención se usa adecuadamente.
- En el método de la presente invención, se mezcla primero un espécimen obtenido de un sujeto con el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de metal alcalino y se mide el primer tiempo de coagulación.
- El espécimen que se utiliza en la medición puede ser sangre obtenida del sujeto, preferentemente plasma obtenido de la sangre, más preferentemente plasma después de la eliminación de las plaquetas. Además, preferentemente, se utiliza como espécimen una mezcla de plasma del sujeto y plasma normal o plasma normal después de la eliminación de las plaquetas. La utilización de una mezcla que contiene plasma normal como espécimen es ventajosa en la prevención de la prolongación del tiempo de coagulación causada por la deficiencia de un factor de coagulación en el sujeto, así como mejorar la sensibilidad de detección en un ensayo de detección de un trastorno de la coagulación sanguínea dependiente de fosfolípidos. La relación de la mezcla del plasma del sujeto con respecto al plasma normal generalmente puede variar de 4:1 a 1:4 y, preferentemente, es de 1:1.
- En el método de la presente invención, el espécimen se puede dividir en dos partes. Una se puede utilizar para medir el primer tiempo de coagulación y la otra se puede utilizar para medir el segundo tiempo de coagulación.
- Uno de los dos especímenes divididos se puede mezclar con el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Cuando el reactivo está compuesto por el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial, el espécimen puede mezclarse con una mezcla del primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial, o una mezcla del espécimen y el primer reactivo parcial (o el segundo reactivo parcial) se puede mezclar con el segundo reactivo parcial (o el primer reactivo parcial).

La relación de la mezcla (relación de volumen) del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación respecto al espécimen puede ser desde aproximadamente 4:1 a 1:4, preferentemente de 1:1.

5 Cuando el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial se añaden por separado al espécimen, se puede incubar una mezcla del espécimen y el reactivo parcial tras añadir el primer reactivo parcial (o el segundo reactivo parcial) o antes de añadir el segundo reactivo parcial (o el primer reactivo parcial), si fuera necesario. El tiempo de incubación puede ser de aproximadamente 1 a 10 minutos y la temperatura puede ser desde aproximadamente la temperatura ambiente a 45 °C.

10 El espécimen y el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación se mezclan de dicha manera y luego se mide el primer tiempo de coagulación. El método para medir el tiempo de coagulación puede ser un método conocido en la técnica y se puede medir, por ejemplo, utilizando un analizador automático conocido.

15 A continuación, el espécimen se mezcla con el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sal de metal alcalino a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o que no contiene una sal de metal alcalino y se mide el segundo tiempo de coagulación.

20 El segundo tiempo de coagulación se puede medir mezclando el otro de los dos especímenes divididos con el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación. Más particularmente, el proceso de medición se lleva a cabo de la misma manera que se describe en la medición del primer tiempo de coagulación, excepto que el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación se utiliza en lugar del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación.

25 Los tiempos de coagulación primero y segundo se pueden medir sucesivamente o simultáneamente.

Basándose en la diferencia o la relación entre el primero y el segundo tiempo de coagulación medidos como se ha descrito anteriormente, se determina si hay AL contenido en el espécimen. Entre los ejemplos de la diferencia se incluyen un valor que se calcula a partir de la ecuación: "(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)" y un valor calculado a partir de la ecuación: "(el primer tiempo de coagulación)-(el segundo tiempo de coagulación)". Entre los ejemplos de la relación se incluyen un valor que se calcula a partir de la ecuación: "(el segundo tiempo de coagulación)/(el primer tiempo de coagulación)" y un valor calculado a partir de la ecuación: "(el primer tiempo de coagulación)/(el segundo tiempo de coagulación)".

35 En el kit de reactivos de la presente invención, la prolongación del primer tiempo de coagulación por AL se suprime mediante la sal de metal alcalino en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Por lo tanto, se prevé que el primer tiempo de coagulación sea igual o más corto que el segundo tiempo de coagulación.

40 En consecuencia, en el caso donde, por ejemplo, se utilice el valor que se calcula de la ecuación: "(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)" se usa como la diferencia del primero y segundo tiempo de coagulación en el proceso de determinación, puede determinarse que el AL está presente en el espécimen que se obtiene del sujeto cuando el valor es grande. Por el contrario, cuando el valor que se calcula de la ecuación: "(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)" es pequeño (0 o incluye un valor negativo), se puede determinar que el AL no está presente en el espécimen.

45 En el caso donde la presencia o ausencia de LA en el espécimen se determina utilizando, por ejemplo, el valor calculado a partir de la ecuación: "(el segundo tiempo de coagulación)/(el primer tiempo de coagulación)" como la relación del primer tiempo de coagulación y el segundo tiempo de coagulación, se puede evaluar que hay AL presente en el espécimen cuando la relación es grande. Por el contrario, cuando el valor que se calcula de la ecuación: "(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)" es pequeño, se puede determinar que el AL no está presente en el espécimen.

50 El proceso de determinación de la presencia o ausencia de AL en el espécimen se puede llevar a cabo de manera experimental acumulando los datos del primer y segundo tiempo de coagulación del espécimen obtenido de sujetos sanos y sujetos con AL, respectivamente. Desde el punto de vista de la determinación más precisa, es preferible que el proceso de determinación de la presencia o ausencia de AL en el espécimen se lleve a cabo basándose en los resultados obtenidos por la comparación de un valor obtenido basándose en la diferencia o relación entre dicho primer y segundo tiempo de coagulación obtenidos del espécimen del sujeto con respecto a un valor umbral que se describirá más adelante.

55 Es preferible determinar el valor umbral basándose en una relación del tiempo de coagulación del espécimen que se obtiene del sujeto con respecto al tiempo de coagulación del plasma normal, por ejemplo, por índice de Rosner (E. Rosner et al., *Thromb. Haemast.* 1987, 57:144-147) o la relación de lupus (al que también se hace referencia como valor LR) (R. Schjetlein et al., *Thromb. Res.* 1993, 69:239-250).

60

La expresión "Relación de lupus (valor LR)" en el presente documento significa un valor calculado por la Ecuación (I) siguiente.

$$\text{Ecuación (I): Relación de lupus} = (b/a)/(d/c) = bc/ad$$

(en la ecuación (I), a, b, c y d respectivamente representan los valores medidos del siguiente modo: a: tiempo de coagulación obtenido a partir del espécimen del sujeto y el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación; b: tiempo de coagulación obtenido a partir del espécimen del sujeto y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación; c: tiempo de coagulación obtenido de un espécimen de un sujeto sano (plasma normal) y el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación; y d: tiempo de coagulación obtenido del espécimen de un sujeto sano (plasma normal) y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación).

En el caso del plasma normal, el valor de LR es aproximadamente 1. Asimismo, el valor de LR de cada uno de los especímenes de los pacientes con deficiencia de factores de coagulación, pacientes a los que se administra warfarina o pacientes a los que se administra heparina es de aproximadamente 1, debido a que no se reconoce la diferencia entre el primero y segundo tiempo de coagulación a pesar del hecho de que el tiempo de coagulación es mayor en comparación con el caso del plasma normal. Por otro lado, en el caso de los especímenes obtenidos de pacientes positivos para AL, el segundo tiempo de coagulación es más largo que el primer tiempo de coagulación debido a la presencia de AL en el espécimen, y, por lo tanto, el valor LR de los pacientes positivos para AL es mayor de 1. En consecuencia, los especímenes que contienen AL, es decir, los especímenes derivados de pacientes positivos a AL se pueden detectar automáticamente comparándolos con el valor de LR del plasma normal.

La sal de metal alcalino que se incluye en el primer y opcionalmente en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que se va a usar en el método de la presente invención no está particularmente limitada, siempre que genere iones de metal alcalino en un disolvente adecuado, preferentemente tampones incluido en los reactivos y no inhiben una reacción de coagulación de sangre dependiente de fosfolípidos. Entre los ejemplos que se pueden usar de sal de metal alcalino se incluyen sales de metales alcalinos de ácidos inorgánicos que son sales de metales alcalinos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, y ácido nítrico. Particularmente, es preferible utilizar ácidos inorgánicos tales como sales de sodio y sales de potasio. Ejemplos específicos de los mismos incluyen cloruro de sodio, sulfato de sodio, nitrato de sodio, cloruro de potasio, y nitrato de potasio. Particularmente, se prefieren cloruro de sodio, sulfato de sodio, y cloruro de potasio. La sal de metal alcalino puede ser un anhídrido o un hidrato.

El primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que se va a usar para el método de la presente invención contiene fosfolípido y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. El fosfolípido puede ser al menos uno seleccionados del grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

El primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que se va a utilizar para el método de la presente invención contienen un activador seleccionado del grupo que consiste en ácido elágico, celite y sílice. El primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que se va a utilizar para el método de la presente invención pueden contener otros componentes tales como veneno de serpiente, un factor tisular y sal de calcio.

En lo sucesivo en el presente documento, se explicarán ejemplos, sin embargo, la presente invención no está limitada a los mismos.

Ejemplos

Se examinó si los especímenes positivos para AL y negativos para AL pueden separarse claramente con un reactivo para la detección de AL que contiene sal de metal alcalino.

Se prepararon reactivos para la detección de AL (dos sistemas de reactivos), basados en el principio de un tiempo de tromboplastina parcial activada. En cuanto a los reactivos para la detección de AL, un reactivo que contiene sal de metal alcalino y fosfolípido se denomina "LA-H" y un reactivo que contiene fosfolípidos a una concentración inferior a la de LA-H se conoce como "LA-L". El reactivo LA-H está compuesto por el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial y el reactivo LA-L está compuesto por el tercer reactivo parcial y el cuarto reactivo parcial.

El primer reactivo parcial contenía 50 mM de HEPES (Kishida Chemical Co., Ltd.), 0,1 mM de ácido elágico (Kishida Chemical Co., Ltd.), 25 mM de Tris (Kishida Chemical Co., Ltd.), 60 µg/ml de PE (Nacalai Tesque, Inc.), 120 µg/ml de PC (Nacalai Tesque, Inc.), y 20 µg/ml de PS (Nacalai Tesque, Inc.), y cloruro de sodio como sal de metal alcalino (a una concentración final de 0,5 % en peso y 1,0 % en peso, Nacalai Tesque, Inc.). Los primeros reactivos parciales, que contienen, respectivamente, sulfato de sodio (a una concentración final de 0,5 % en peso y 1,0 % en peso, Nacalai Tesque, Inc.) y cloruro de potasio (a una concentración final de 0,5 % en peso y 1,0 % en peso, Kishida Chemical Co., Ltd.) se prepararon como sal de metal alcalino. Cada uno de los primeros reactivos parciales incluye ácido elágico que contiene una sal metálica y quelato formado. Como control del primer reactivo parcial, también se preparó un reactivo que no contenía sal de cloruro de metal alcalino. El pH de estos reactivos se ajustó a 7,35.

El tercer reactivo parcial contiene 50 mM de HEPES (Kishida Chemical Co., Ltd.), 0,1 mM de ácido elálgico (Kishida Chemical Co., Ltd.), 25 mM de Tris (Kishida Chemical Co., Ltd.), 15 µg/ml de PE (Nacalai Tesque, Inc.), 30 µg/ml de PC (Nacalai Tesque, Inc.), y 5 µg/ml de PS (Nacalai Tesque, Inc.). El tercer reactivo parcial incluye ácido elálgico que contiene una sal metálica y quelato formado. El pH del tercer reactivo parcial se ajustó a 7,35.

5 El segundo y cuarto reactivos parciales eran una solución preparada disolviendo cloruro de calcio (peso molecular: 111.0, Kishida Chemical Co., Ltd.) en agua purificada a una concentración final de 25 mM.

2. Muestras de medición

10 Los especímenes negativos para AL utilizadas fueron una muestra normal, Coagtrol N (SYSMEX CORPORATION), plasma de 11 donantes sanos (SUNFCO LTD.), plasma heparinizado de 1 paciente (plasma preparado mediante la adición de heparina no fraccionada (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) a Coagtrol N a una concentración final de 0,5 U/ml), plasma de 3 pacientes que tienen una deficiencia del factor de coagulación (George king Bio-Medical, Inc), y
15 plasma de 2 pacientes a los que se ha administrado warfarina (George king Bio-Medical, Inc).

Los especímenes positivos para AL utilizados fueron plasma de 11 pacientes positivos para AL (SUNFCO LTD).

3. Medición de los tiempos de coagulación

20 Se prepararon dos grupos de 50 µl de los especímenes. Los especímenes de uno de los grupos se mezclaron con 50 µl del primer reactivo parcial. Los especímenes del otro grupo se mezclaron con 50 µl del tercer reactivo parcial. Las mezclas resultantes se calentaron a 37 °C durante 3 minutos. A continuación, dichas mezclas se mezclaron con
25 50 µl del segundo reactivo parcial (o el cuarto reactivo parcial) y se midió el tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación se midió con un analizador de coagulación automático "Coagrex-800" (Shimadzu Corp.).

4. Cálculo de la relación de lupus

30 La relación del lupus se calculó a partir de los tiempos de coagulación obtenidos midiendo el tiempo de coagulación de cada espécimen de acuerdo con la ecuación siguiente.

$$\text{Ecuación: (Relación de lupus) = (b/a)/(d/c)=bc/ad}$$

35 (en la ecuación, a, b, c y d respectivamente representan los valores medidos del siguiente modo: a: tiempo de coagulación obtenido del espécimen de AL y los reactivos LA-H; b: tiempo de coagulación obtenido del espécimen de AL y el reactivo LA-L; c: tiempo de coagulación obtenido de la muestra normal y los reactivos LA-H; y d: tiempo de coagulación obtenido de la muestra normal y el reactivo LA-L).

40 La distribución de la relación de lupus relativa a cada uno de los reactivos para la detección de AL que se ha calculado a partir del espécimen negativo a AL y el espécimen positivo a AL se muestra en las Figuras 1 a 3. Las figuras 1 a 3 muestran que la relación de lupus del espécimen positivo a AL se incrementa en el sistema de medición usando el reactivo que contiene sal de metal alcalino. Por lo tanto, se ha confirmado que el kit de reactivos para la detección de AL de la presente invención puede separar más claramente el espécimen positivo para AL del
45 espécimen negativo a AL en comparación con los kits de reactivos convencionales que no contienen sal de metal alcalino.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico que comprende:
 - 5 un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación; y
un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación;
donde al menos uno del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación y el segundo reactivo de
medición del tiempo de coagulación contiene sal de metal alcalino y
10 el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene sal de metal alcalino a una concentración
inferior a la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene sal de metal alcalino;
donde el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípido y el segundo reactivo de
medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípido a una concentración menor que la del primer reactivo de
medición del tiempo de coagulación; y
15 donde el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen un activador seleccionado
del grupo que consiste en ácido elálgico, celite y sílice.
 2. El kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal de
metal alcalino es sal de metal alcalino de ácido inorgánico.
 - 20 3. El kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1 o 2, donde la sal de metal alcalino es sal de sodio o sal de potasio.
 4. El kit de reactivos para la detección de anticoagulante lúpico de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que
25 contiene sal de calcio.
5. Un método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico que comprende las etapas de:
 - 30 mezclar un espécimen que se obtiene de un sujeto con un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación
que contiene una sal de metal alcalino para medir el primer tiempo de coagulación;
mezclar el espécimen con un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de
metal alcalino a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o que
no contiene una sal de metal alcalino para medir el segundo tiempo de coagulación, donde el primer reactivo de
medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípido y el segundo reactivo de medición del tiempo de
35 coagulación contiene fosfolípido a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de
coagulación; y
determinar si el AL está contenido en el espécimen basándose en la diferencia o la relación entre el primer y el
segundo tiempo de coagulación medidos;
 - 40 donde el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen un activador seleccionado del
grupo que consiste en ácido elálgico, celite y sílice.
6. El método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con la reivindicación
5, donde
45 se determina si el anticoagulante lúpico está contenido en el espécimen mediante la comparación de un valor
obtenido basándose en la diferencia o la relación entre dichos primero y segundo tiempos de coagulación a un
valor umbral predeterminado, donde dicho valor umbral se determina en base a una relación entre el tiempo de
coagulación del espécimen obtenido del sujeto y el tiempo de coagulación del plasma normal.
50
7. El método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con una cualquiera
de las reivindicaciones 5 o 6, donde la sal de metal alcalino es sal de metal alcalino de ácido inorgánico.
8. El método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con una cualquiera
de las reivindicaciones 5 a 7, donde la sal de metal alcalino es sal de sodio o sal de potasio.
55

FIG. 1

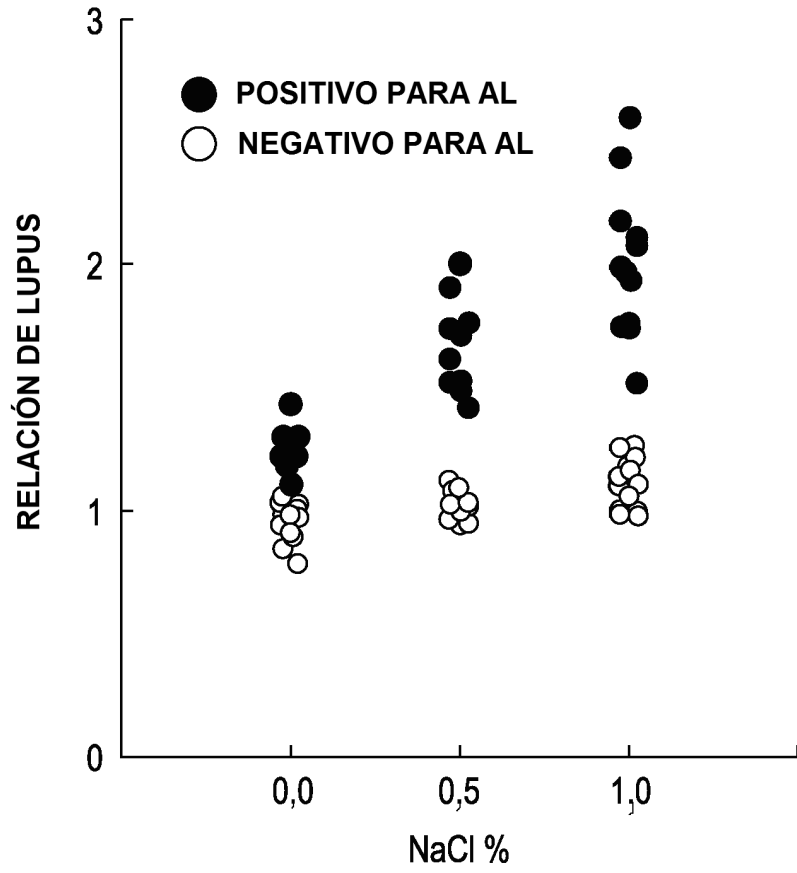


FIG. 2

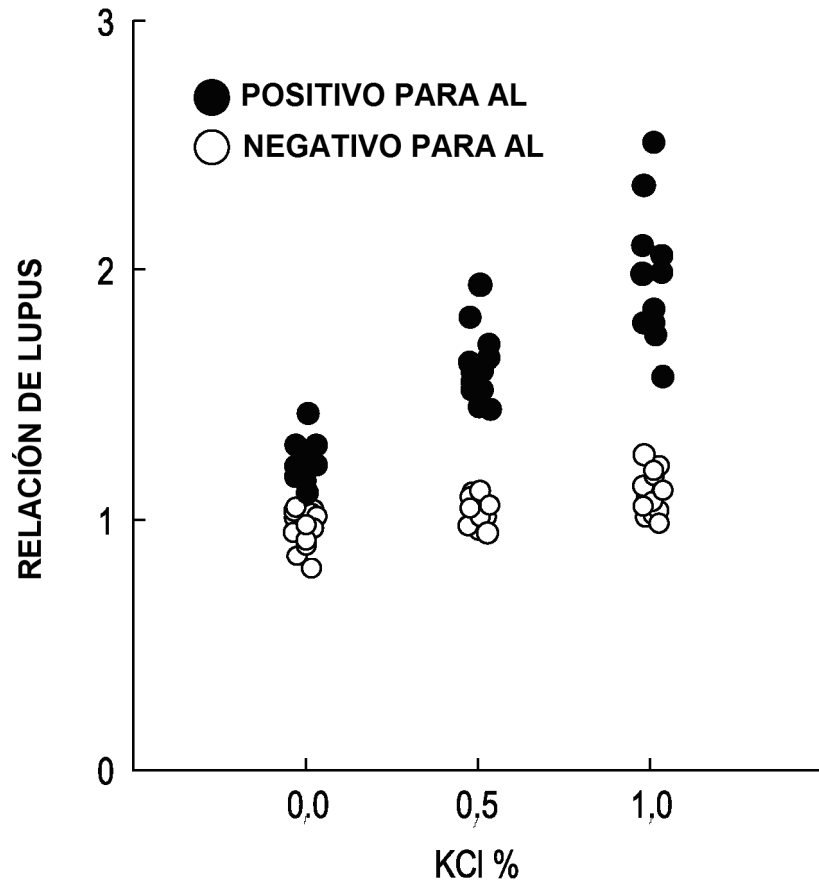


FIG. 3

