

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 800**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 17158368 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3228714**

54 Título: **Ensayo de hemostasis basado en la quimioluminiscencia**

30 Prioridad:

14.12.2010 NL 2005858
14.12.2010 US 422751 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2019

73 Titular/es:

STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (100.0%)
Geert Grooteplein-Zuid 10
6525 GA Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

VAN HEERDE, WAANDER LAURENS y
BLAAUW, RICHARD HENDRIK

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 729 800 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

Ensayo de hemostasis basado en la quimioluminiscencia

Campo de la invención

5 [0001] La presente invención está en el campo de la medicina, en particular en el campo de la coagulación sanguínea. Más específicamente, la invención se refiere a un método novedoso para la medición directa de la generación de plasmina usando un sustrato que produce una señal óptica tras la activación por un factor de coagulación sanguínea y/o fibrinolítico de interés. 'Directa' en la frase precedente significa que no es necesario transformar o adaptar la señal generada.

Antecedentes de la invención

10 [0002] El equilibrio hemostático depende de las interacciones entre las plaquetas, la coagulación de las paredes vasculares y la fibrinólisis. Cuando se lesiona la pared vascular, las plaquetas se adhieren al subendotelio y forman agregados. A continuación, se inicia la coagulación dando como resultado en última instancia la producción de fibras de fibrina que estabilizan el tapón plaquetario. Todos estos pasos son importantes para formar un coágulo de sangre estable que sea resistente a las fuerzas reológicas del flujo sanguíneo. La trombina es una pieza clave
15 en estos procesos, ya que es responsable de un concierto entero de reacciones, por ejemplo, solidifica la sangre mediante la formación de fibrina, activa las plaquetas, activa mecanismos de retroalimentación positiva e interactúa con los receptores endoteliales para iniciar mecanismos de retroalimentación negativa. Las plaquetas activadas, a su vez, catalizan la formación de trombina. La trombina tiene una vida media corta, de aproximadamente unos pocos minutos, que está causada por la unión de inhibidores de trombina como la antitrombina. Las antitrombinas actúan también como proteínas reguladoras, que pueden inactivar las primeras trazas de trombina antes de que
20 puedan aumentar la generación de trombina mediante reacciones de retroalimentación positiva. Esto evita la formación sistémica de coágulos. La fibrinólisis solubiliza a su vez la fibrina que contiene el tapón plaquetario. El desequilibrio de este equilibrio hemostático en uno o más compartimentos (pared vascular, células sanguíneas, coagulación y fibrinólisis) puede resultar en una respuesta trombótica o un fenotipo hemorrágico que puede incluso ser mortal.
25

[0003] Cuando se producen anomalías en el sistema hemostático, resulta esencial diagnosticar, monitorizar y tratar al paciente para optimizar la intervención terapéutica.

[0004] Los ensayos de hemostasis conocidos implican ensayos de punto final, que detectan el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo (ensayos de coagulación) o la lisis del coágulo en tiempo real por medio de una turbidimetría (ensayos de fibrinólisis). Aunque se realizan rutinariamente, los ensayos de coagulación actualmente
30 disponibles tienen limitaciones inherentes que los hacen potencialmente poco fiables como herramientas para controlar una coagulación aumentada. Además, no siempre hay una buena correlación entre los resultados de las pruebas de coagulación y la prevención de una hemorragia postoperatoria o una trombosis recurrente (Hemker et al. Curr. Opin. in Hematology 2004, 11: 170-175).

35 [0005] La mayor parte de las limitaciones se refieren al hecho de que estas son pruebas de punto final que miden el tiempo de formación de coágulos *in vitro* y requieren la adición de reactivos exógenos (tales como factor tisular, caolín y iones de Ca^{2+} para reponer aquellos unidos a un anticoagulante), y por tanto no reflejan necesariamente el potencial trombótico del paciente (potencial de coagulación).

40 [0006] En comparación con las pruebas anteriormente descritas, EP 420 332 divulga un ensayo de generación de trombina mejorado. En este ensayo no solo se recoge información acerca de la coagulación del plasma sino también acerca de la generación de trombina total después de la formación de coágulos. Estos ensayos se realizaron primero con sustratos cromogénicos y, más adelante, con sustratos fluorogénicos. Además, se divulgan varios ensayos de generación de trombina con plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas.

45 [0007] Los cromóforos (por ejemplo, la p-nitroanilina [p-NA]) usados en los ensayos cromogénicos se evalúan típicamente usando una longitud de onda de 405 nm. Un inconveniente importante de los sustratos cromogénicos es que tanto la fibrina como las plaquetas en soluciones acuosas interfieren con la evaluación de los sustratos cromogénicos a 405 nm, y que la medición como tal es poco fiable. Por lo tanto, el uso de sustratos fluorogénicos es hoy en día más popular. Los sustratos fluorogénicos son análogos a los sustratos cromogénicos. La diferencia es que, tras la acción enzimática, los sustratos liberan un grupo que se puede determinar con alta sensibilidad
50 usando un fluorómetro. La evaluación fluorométrica de la generación de trombina tiene además la ventaja de que la fibrina o las plaquetas no interfieren con el análisis.

[0008] Además, el uso de sustratos fluorogénicos múltiples con diferentes características permiten la detección de varios productos en una muestra como se describe en WO 2006/072602. El uso de sustratos fluorogénicos tiene también desventajas significativas: el equipo de laboratorio estándar usado para el análisis del sistema de coagulación no soporta el análisis fluorométrico. Por tanto, el análisis requiere instrumental adicional (fluorómetro).
 5 Además, la tendencia de la última década ha sido implementar todas las pruebas de coagulación siempre que sea posible en un analizador para simplificar el procedimiento de prueba y minimizar los costes de trabajo. El uso de un instrumento separado para medir la generación de trombina reduce significativamente su aplicabilidad como método rutinario. Además, la señal fluorescente tiene el inconveniente de no ser lineal con la concentración del producto.

[0009] US 5,035,999 divulga la determinación de actividades enzimáticas usando derivados de la aminoluciferina. Dichos sustratos se pueden usar para permitir la determinación de enzimas capaces de escindir el derivado de aminoluciferina para liberar aminoluciferina. La aminoluciferina liberada se puede detectar de manera luminométrica mediante la reacción de la aminoluciferina con una luciferasa en presencia de ATP y $MgCl_2$.

[0010] Schousboe I (Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1997, Vol. 8, páginas 97-104) divulga que la piroGlu-Phe-Lys-pNA (conocida como S-2403) es un sustrato cromogénico de la plasmina.

[0011] Hay una necesidad de un ensayo nuevo para medir la generación de trombina y la generación de otros factores de coagulación sanguínea que no tenga los inconvenientes indicados anteriormente, que sea más simple y pueda medir la generación de coagulación sanguínea y factores fibrinolíticos tales como la trombina y la plasmina de una manera directa, preferiblemente de un modo lineal. Es un objeto de la presente invención proporcionar tal ensayo.

20 Resumen de la invención

[0012] La presente invención proporciona un método para determinar *in vitro* en una muestra de ensayo la generación de un factor hemostático, donde dicho factor hemostático es la plasmina, que comprende determinar la cantidad de dicho factor hemostático generado usando un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático, donde una molécula luminiscente es liberada de dicho sustrato quimioluminiscente por dicho factor hemostático, donde dicha molécula luminiscente se convierte posteriormente para producir un cuanto de luz detectable, y donde los sustratos quimioluminiscentes son sustratos como se indican en la reivindicación 1. La incorporación de una molécula quimioluminiscente en un sustrato para la trombina se ha sugerido en WO 93/22453. Sin embargo, WO 93/22453 no revela ningún sustrato quimioluminiscente adecuado. Además, la metodología para determinar la generación de trombina descrita en WO 93/22453 está exclusivamente dirigida hacia ensayos basados en la fluorescencia.

[0013] Para proporcionar un ensayo que dependa del uso de sustratos quimioluminiscentes han tenido que resolverse varias dificultades, incluyendo, no en el último lugar, el desarrollo real de sustratos quimioluminiscentes adecuados que sean escindidos de manera eficaz y con suficiente especificidad por factores hemostáticos. Al mismo tiempo, aquellas personas expertas en la técnica habrían supuesto que los ensayos basados en la quimioluminiscencia serían demasiado complejos y, de hecho, inviables. El ensayo para, por ejemplo, la generación de trombina o plasmina, que en sí mismo es ya complejo, se vuelve aún más complejo, ya que se añade otra reacción a la ecuación. Además, la quimioluminiscencia se ha supuesto siempre difícil de medir en la sangre.

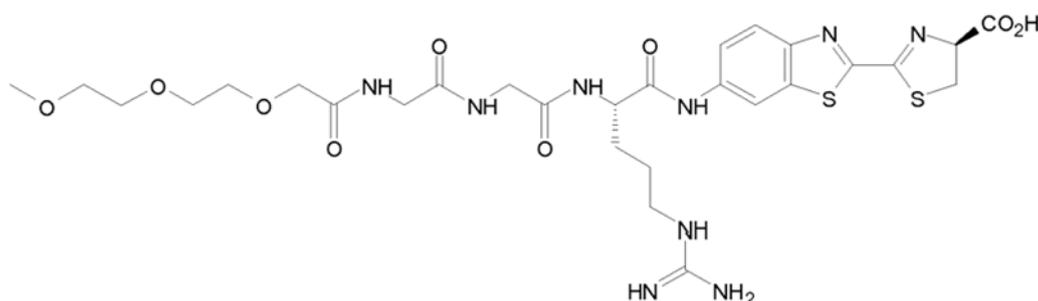
[0014] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar *in vitro* la generación de un factor hemostático en una muestra de ensayo que comprende determinar la cantidad de dicho factor hemostático, que es plasmina, generado usando un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático, donde preferiblemente una molécula quimioluminiscente es liberada por un factor hemostático que se convierte posteriormente para producir un cuanto de luz detectable.

[0015] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de ensayo, que comprende un primer recipiente que contiene un sustrato quimioluminiscente específico para la plasmina como se indica en la reivindicación 8 y uno, dos, tres o más recipientes adicionales que contiene cada uno un reactivo distinto seleccionado del grupo que consiste en luciferasa, adenosina-5'-trifosfato (ATP), una fuente de Mg^{2+} y una o más moléculas activadoras para inducir la generación de plasmina. La presente solicitud divulga también un kit para determinar *in vitro* la generación de trombina en una muestra de ensayo, que comprende un primer recipiente que contiene un sustrato de trombina quimioluminiscente, y uno, dos, tres o más recipientes adicionales, que contiene cada uno un reactivo distinto seleccionado del grupo que consiste en luciferasa, ATP, una fuente de Mg^{2+} y una o más moléculas activadoras para inducir la generación de trombina.

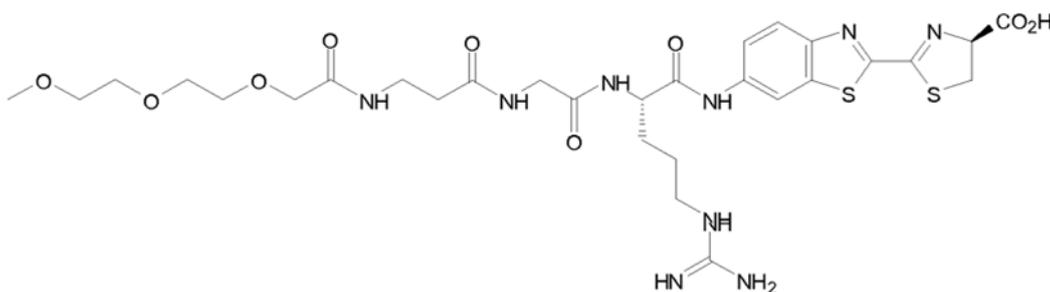
[0016] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de ensayo, que comprende un primer recipiente que contiene un sustrato de plasmina quimioluminiscente, y uno, dos, tres o más recipientes adicionales donde cada recipiente comprende un reactivo

distinto seleccionado del grupo que consiste en luciferasa, ATP, una fuente de Mg^{2+} y una o más moléculas activadoras para inducir la generación de plasmina. Además, la divulgación trata también de sustratos de trombina quimioluminiscentes novedosos, en particular RO-[CH₂CH₂O]_n-(Sp)-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina y RO-[CH₂CH₂O]_n-(Sp)-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, o una sal derivada, donde R es H o un alquilo C₁-C₆, n es un número entero en el intervalo de 0-10, Sp es una fracción separadora opcional. Preferiblemente, n está en el intervalo de 1-8, más preferiblemente en el intervalo de 2-5. En una forma de realización R es CH₃. En una forma de realización está presente una fracción separadora. Una fracción separadora preferida es [CH₂]_mC=O, donde m es un número entero en el intervalo de 1-6, preferiblemente 1-4. Una fracción separadora preferida es CH₂C=O. En un ejemplo, los sustratos de trombina quimioluminiscentes que pueden usarse adecuadamente de acuerdo con la presente divulgación son CH₃O(CH₂CH₂O)₂-acetil-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina o una sal derivada (fórmula 1) y CH₃O(CH₂CH₂O)₂-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina (fórmula 2) o una sal derivada. En un ejemplo, el sustrato es una sal de TFA (ácido trifluoroacético). Estos sustratos de trombina quimioluminiscentes novedosos se pueden representar con las siguientes fórmulas estructurales:

Fórmula 1



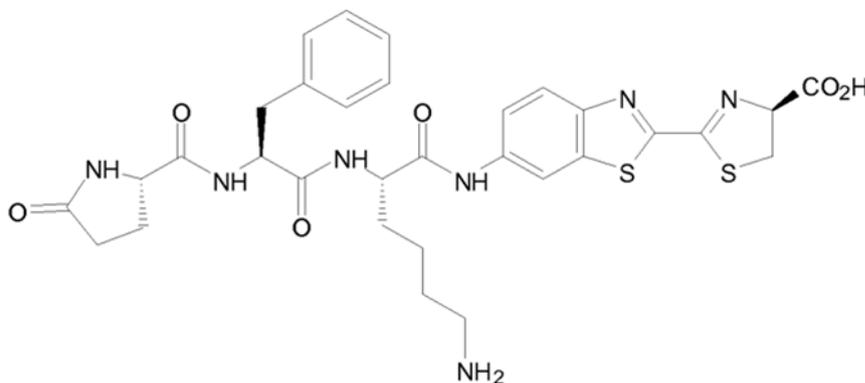
Fórmula 2



15

[0017] En otro aspecto, la invención trata de un sustrato de plasmina quimioluminiscente novedoso que puede usarse adecuadamente de acuerdo con la presente invención, en particular piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina o una sal derivada (fórmula 3). En una forma de realización, el sustrato es una sal de TFA (ácido trifluoroacético). Este sustrato de plasmina quimioluminiscente novedoso se puede representar con la siguiente fórmula estructural:

Fórmula 3



20

Los sustratos quimioluminiscentes preferidos según la divulgación son:

- B-X-Arg-NH-Y, X-Arg-NH-Y, B-X-Lys-NH-Y o X-Lys-NH-Y, donde B es un grupo protector aminoterminal, preferiblemente Fmoc; Cbz; t-Boc; acetilo; PEG_n, PEG_n-acetilo, donde n es un número entero, preferiblemente en el intervalo de 1-5, y sus derivados PEG(metil)éter; donde Y es una molécula indicadora quimioluminiscente unida al péptido por un enlace amida hidrolizable, preferiblemente Y es aminoluciferina; donde X puede ser cualquier secuencia de aminoácidos, dipéptido, tripéptido o similares y puede o puede no incluir una molécula separadora, donde X es preferiblemente beta-Ala-Gly o piroGlu-Phe;
- piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina;
- CH₃O(CH₂CH₂O)_n-acetil-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 2;
- CH₃O(CH₂CH₂O)_n-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 4;
- una sal de los sustratos anteriores, preferiblemente la sal de TFA.

Descripción detallada de formas de realización

[0018] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de ensayo que comprende determinar la cantidad de dicho factor hemostático generado usando un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático, donde una molécula luminiscente es liberada de dicho sustrato quimioluminiscente por dicho factor hemostático, que se convierte posteriormente para producir un cuanto de luz detectable. Los sustratos quimioluminiscentes usados se indican en la reivindicación 1.

[0019] Los presentes inventores han descubierto que, usando tales sustratos, la generación de plasmina se puede medir de manera continua, de manera semicontinua o de una manera directa sin requerir el cálculo de la primera derivada como se requiere para el método cromogénico o fluorogénico para medir la generación de factores de coagulación sanguínea, por ejemplo, la trombina, y/o factores fibrinolíticos, por ejemplo, la plasmina. Típicamente, tras la escisión de un sustrato de la invención por un factor hemostático de interés, se libera una 'molécula luminiscente' que es propensa a una posterior conversión química o enzimática que produce una señal luminosa detectable (o "cuanto de luz"). Debido a que el cuanto de luz se produce en un paso irreversible, no hay acumulación de la señal de salida. Es una ventaja significativa del presente método, en comparación con los métodos existentes que emplean sustratos fluorescentes, que se pueda detectar en tiempo real una señal que es directamente proporcional a la cantidad del factor hemostático presente en cualquier punto temporal dado; no es necesario calcular la primera derivada de una señal óptica acumulativa. En el presente método no hay interferencia con la producción posterior de señales lumínicas. Además, no se requiere ninguna fuente luminosa externa ni filtros ópticos para medir la señal. Así, el método de la presente invención es mucho más conveniente que los métodos de la técnica anterior.

[0020] En general, la presente invención proporciona un método sensible mejorado para controlar la generación de plasmina en una muestra de ensayo. El método de la presente invención permite el diseño de un dispositivo óptico para el centro de atención para medir la generación de uno o más factores hemostáticos.

[0021] El factor hemostático puede ser cualquier factor de coagulación sanguínea y se puede seleccionar del grupo de las serina proteasas, en particular las serina endopeptidasas (EC 3.4.21), preferiblemente seleccionado del grupo consistente en trombina, factor Xa, plasmina, factor VIIa, factor IXa, calicreína plasmática, factor XIIIa, factor XIa, activador tisular del plasminógeno (tPA), preferiblemente tc-tPA, proteína C activada y uroquinasa (uPA), preferiblemente tc-UPA. En una forma de realización, el factor hemostático se selecciona de la trombina y la plasmina.

[0022] La generación de factores hemostáticos puede detectarse usando una aminoluciferina modificada con amino, modificación que comprende un sustrato para el factor hemostático que se genera. Los sustratos adecuados para controlar la reacción de coagulación incluyen péptidos derivados que son escindidos específicamente por dicho factor hemostático, por ejemplo, el factor de coagulación sanguínea trombina o el factor fibrinolítico plasmina, que se produce como un evento final en la vía de coagulación o después de la formación de la fibrina. Los péptidos están unidos a una molécula indicadora quimioluminiscente, tal como la aminoluciferina, que todavía retiene la capacidad de ser escindida. El factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, la trombina o la plasmina, es capaz de reconocer el péptido, escindir el conector escindible, y se forma una molécula indicadora quimioluminiscente, tal como la aminoluciferina, que, en presencia de ATP, luciferasa y opcionalmente Mg²⁺, resulta típicamente en la emisión de luz.

[0023] El método de la invención se puede usar para determinar los efectos de fármacos, inhibidores, proteínas, células u otros aditivos en la generación de plasmina. Para medir el efecto de tales aditivos, se pueden añadir a la mezcla reactiva. Estos aditivos también pueden recubrir los pocillos del recipiente donde se realiza el ensayo, tal

como los pocillos de placas de 96 pocillos. Cuando las células endoteliales son parte de la mezcla reactiva, se pueden cultivar en los pocillos.

[0024] La señal luminiscente se puede medir por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de detección adecuados comprenden el uso de un equipo de detección de luz, que incluye, sin limitación, un luminómetro, una cámara de dispositivo acoplado por carga (CCD), una película radiográfica y una película fotográfica de alta velocidad. Típicamente, dicho luminómetro comprende un tubo fotomultiplicador (PMT) sensible al azul, un tubo fotomultiplicador (PMT) sensible al rojo u otros PMT optimizados para aplicaciones específicas. Preferiblemente, dichos métodos de detección de luz incluyen además el uso de un dispositivo de filtración óptica para bloquear o reducir la emisión no deseada de luz tanto del sustrato como del producto. Los métodos de detección pueden incluir además un método y/o un dispositivo para detectar o registrar luz de una manera secuencial que elimina o reduce la señal no deseada del sustrato. Dicha señal luminiscente se mide preferiblemente de manera continua, de manera semicontinua o de una manera no continua. La cantidad de factor hemostático (por ejemplo, trombina o plasmina) es directamente proporcional a la señal medida, de manera que no es necesario convertir la señal medida en una primera derivada. Por lo tanto, se proporciona un método tal y como se ha definido antes en la presente, donde la determinación de la cantidad de dicho factor hemostático generado midiendo una señal luminiscente no implica calcular la primera derivada de dicha señal luminiscente. En un ejemplo, el método de la divulgación comprende: proporcionar una mezcla reactiva que comprende una muestra de ensayo que va a evaluarse, una molécula activadora para inducir la generación de un factor hemostático, por ejemplo, trombina y/o plasmina, y un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático, por ejemplo, trombina o plasmina; y determinar la cantidad de dicho factor hemostático, tal como trombina o plasmina, generado midiendo una señal luminiscente, preferiblemente usando una luciferasa, típicamente en presencia de ATP. Preferiblemente, la mezcla reactiva que se proporciona comprende Mg^{2+} .

[0025] La mezcla reactiva puede comprender uno o más iniciadores de la coagulación. Se puede emplear una variedad de iniciadores de la coagulación adecuados. Tales iniciadores desencadenan las vías de coagulación en los puntos estándares que se usan comúnmente para pruebas médicas. Por ejemplo, el factor tisular iniciador de la vía de coagulación extrínseca activará, junto con el factor VII y el calcio, el factor X, ya sea directa o indirectamente a través de la activación primero del factor IX. El iniciador de la vía de coagulación intrínseca activará el factor XII para activar a su vez el factor XI. Los iniciadores adecuados de la vía de coagulación extrínseca se conocen bien en la técnica e incluyen un factor tisular y similares. Los iniciadores adecuados para la vía de coagulación intrínseca son también bien conocidos en la técnica e incluyen el ácido elálgico, el caolín, la sílice y similares. La descripción de estos y otros iniciadores se proporciona en Laboratory Evaluation of Hemostasis and Thrombosis (tercera edición), 1983, Marjorie S. Sirtidge y Reaner Shannon, Lea y Febiger, Filadelfia; y Hemostasis and Thrombosis, a conceptual approach (segunda edición), 1983, Jack Hirsh y Elizabeth Brain, Churchill Livingstone, Nueva York.

[0026] La mezcla reactiva también contiene adecuadamente estructuras con una superficie que contiene fosfolípidos. La superficie que contiene fosfolípidos comprende adecuadamente fosfolípidos cargados negativamente, es decir, fosfolípidos aniónicos, tales como la fosfatidilserina. Los ejemplos adecuados de las mismas incluyen vesículas fosfolípídicas, cefalina, células, en particular células endoteliales (activadas), plaquetas sanguíneas (activadas), bacterias, virus, matrices de células endoteliales (activadas) o microvesículas u otras estructuras adecuadas conocidas por la persona experta en la materia. La presencia de tales estructuras es ventajosa particularmente en formas de realización relativas a factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Tales factores de coagulación dependientes de la vitamina K se unen a superficies que contienen fosfolípidos aniónicos a través de los denominados dominios GLA. Los cofactores también se unen típicamente a las superficies. La presencia de estructuras que expresan superficies que contienen fosfolípidos aniónicos acelera varios órdenes de magnitud la reacción de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K.

[0027] La mezcla reactiva también puede incluir fibrina, un fragmento de fibrina o una sustancia de generación de fibrina. La fibrina es un cofactor importante para la generación de plasmina inducida por tPA. Así, en una forma de realización, la mezcla reactiva comprende fibrina o un fragmento de fibrina adecuado para actuar como un cofactor para la generación de plasmina.

[0028] En una forma de realización, el sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático comprende un péptido que comprende un sitio de escisión específico para dicho factor hemostático unido de manera covalente o de otro modo acoplado a, preferiblemente, el grupo amino de la aminoluciferina o al derivado modificado en el extremo carboxilo terminal a través de un enlace peptídico. Preferiblemente, el extremo N-terminal del sustrato se modifica para evitar la degradación por las aminopeptidasas, por ejemplo, usando un grupo protector aminoterminal; estos son conocidos por la persona experta en la técnica. En caso de que el factor hemostático sea la trombina, el sustrato de trombina quimioluminiscente puede comprender un péptido que comprende un sitio de escisión por trombina acoplado a la aminoluciferina. En caso de que el factor hemostático sea la plasmina, el sustrato de plasmina quimioluminiscente comprende un péptido que comprende un sitio de escisión por plasmina acoplado a la aminoluciferina.

[0029] En ausencia del factor hemostático apropiado, una mezcla que comprende un sustrato específico para un factor hemostático generará una cantidad de luz mínima, ya que está presente una cantidad mínima de aminoluciferina libre. En presencia del factor hemostático apropiado, el enlace peptídico que une el sustrato y la aminoluciferina puede ser escindido por el factor hemostático para producir aminoluciferina, un sustrato para la luciferasa. Por lo tanto, en presencia de luciferasa se genera luz, que es proporcional a la cantidad de factor hemostático generado.

[0030] El sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático puede ser de la forma B-X-Arg-NH-Y, X-Arg-NH-Y, B-X-Lys-NH-Y o X-Lys-NH-Y, donde B es un grupo protector aminoterminal y X puede ser cualquier secuencia de aminoácidos, dipéptido, tripéptido o similares y puede o puede no incluir una molécula separadora; preferiblemente, X es beta-Ala-Gly o piroGlu-Phe. Los grupos protectores aminoterminales adecuados incluyen, sin limitación, Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo), Cbz (benciloxicarbonilo), t-Boc (tert-butiloxicarbonilo), acetilo, PEG_n y PEG_n-acetilo donde n está en el intervalo de 1-20, preferiblemente en el intervalo de 1-10, preferiblemente en el intervalo de 1-8, más preferiblemente en el intervalo de 1-5, más preferiblemente n es 5, y sus derivados PEG (metil)éter. Y es la molécula indicadora quimioluminiscente, unida al péptido por un enlace amida hidrolizable. Típicamente, Y será convertido por la luciferasa y, por lo tanto, producirá un cuanto de luz solo después de que el enlace amídico haya sido hidrolizado por dicho factor hemostático, por ejemplo, la trombina o la plasmina. Antes de la hidrólisis del enlace amídico, la molécula indicadora no puede ser convertida. En una forma de realización adecuada, Y puede ser la aminoluciferina.

[0031] Los péptidos ejemplares de sustrato para la trombina incluyen beta-Ala-Gly-Arg unido a aminoluciferina, PEG_n-acetil-Gly-Gly-Arg unido a aminoluciferina, donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, más preferiblemente n es 3, y PEG_n-acetil-beta-Ala-Gly-Arg unido a aminoluciferina, donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, más preferiblemente n = 5. Preferiblemente, PEG está en la forma de su éter metílico, por tanto, CH₃O(CH₂CH₂O)_n. Debe observarse que, en las formas de realización de la invención, PEG_n corresponde a CH₃O(CH₂CH₂O)_{n-1}; por ejemplo, PEG₃ corresponde a CH₃O(CH₂CH₂O)₂. Los últimos dos sustratos (PEG_n-acetil-Gly-Gly-Arg unido a aminoluciferina y PEG_n-acetil-beta-Ala-Gly-Arg unido a aminoluciferina) son particularmente adecuados, ya que son solubles y son escindidos por la trombina. Los sustratos que comprenden beta-Ala-Gly-Arg unido a aminoluciferina se prefieren especialmente, ya que tienen una alta especificidad por la trombina y no son sensibles a, por ejemplo, la plasmina. Los sustratos que comprenden Gly-Gly-Arg-aminoluciferina pueden ser sensibles a, por ejemplo, la plasmina, que puede estar presente en el plasma.

[0032] Los péptidos ejemplares de sustrato para la plasmina incluyen Cbz-Phe-Arg-aminoluciferina, Ac-Phe-Arg-aminoluciferina, Phe-Arg-aminoluciferina y PEG_n-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina, donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, más preferiblemente n es 5. Preferiblemente, PEG está en la forma de su éter metílico, por tanto, CH₃O(CH₂CH₂O)_n. Otro sustrato preferido es piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina o la sal de TFA derivada.

[0033] Otros ejemplos de la presente descripción son:

- CH₃O(CH₂CH₂O)_n-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 4;
- CH₃O(CH₂CH₂O)_n-acetil-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 2;
- una sal de los sustratos anteriores, preferiblemente la sal de TFA.

[0034] La mezcla reactiva puede comprender además una luciferasa capaz de convertir la aminoluciferina en amino-oxiluciferina, y ATP y preferiblemente comprende además Mg²⁺. El principio de quimioluminiscencia que implica la luciferasa se bien conocido por la persona experta. Típicamente usa luciferasa, luciferina, ATP y oxígeno para la producción de fotones. La luciferasa cataliza la conjugación de luciferina con ATP y la oxidación posterior del intermediario luciferil-AMP. En última instancia, la luciferasa proporciona un entorno donde el intermediario de la luciferina oxidada se reordena para producir oxiluciferina y un fotón único con una eficiencia cuántica elevada. La intensidad de la luz resultante de tal luminiscencia depende de las concentraciones de los componentes implicados en la conversión química o enzimática de la molécula luminiscente liberada. Usando un exceso de tales componentes, la señal luminiscente del método de la invención se vuelve dependiente solo de la generación de moléculas luminiscentes libres por escisión del sustrato por el factor hemostático de interés, por ejemplo, la trombina o la plasmina. Bajo tales circunstancias, la intensidad de la luz es por tanto proporcional a la generación de dicho factor hemostático, por ejemplo, la generación de trombina o plasmina.

[0035] La reacción puede comprender además iones magnesio, ya que se ha observado que estos magnifican la señal luminiscente generada. Sin embargo, también es posible conseguir este efecto con otros cationes bivalentes.

[0036] La luciferasa puede ser cualquier luciferasa conocida en la técnica o que todavía ha de descubrirse o diseñarse. Muchas luciferasas se conocen en la técnica. Se pueden obtener comercialmente de fabricantes tales

como Promega, Sigma y similares. La luciferasa puede ser una luciferasa nativa, recombinante o mutante. Dicha luciferasa mutante puede ser una luciferasa modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones de aminoácidos o inserciones de aminoácidos, siempre y cuando retenga su actividad de luciferasa, preferiblemente al menos un 25%, un 50%, un 75% de la actividad de luciferasa de la luciferasa nativa (recombinante). Se puede derivar de cualquier organismo, siempre y cuando tenga actividad de luciferasa.

5

[0037] La muestra de ensayo puede ser cualquier tipo de muestra de ensayo conocida por la persona experta. La muestra de ensayo se puede seleccionar del grupo que consiste en células, fluidos fisiológicos, sangre, orina, esputo y similares. En una forma de realización adecuada, la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre total, líquido de drenaje, plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas.

10

[0038] La molécula activadora para inducir la generación de dicho factor de coagulación sanguínea, tal como la trombina, puede ser un iniciador de la vía extrínseca, en particular el factor tisular, o de la vía intrínseca, en particular seleccionado del grupo que consiste en vidrio, sílice, caolín y ácido elágico. La molécula activadora *in vivo* para inducir la generación de factores de coagulación sanguínea tal como la trombina es, adecuadamente, el factor tisular (TF). El FT media la formación de trombina formando complejos con el factor VIIa para convertir directamente el factor X en el factor Xa (vía extrínseca), o indirectamente generando el factor Xa por conversión del factor IX en factor IXa, que, a su vez, forma complejos con el factor VIIIa para convertir el factor X en factor Xa. El factor Xa, una vez generado, forma complejos con su cofactor, V(a), para convertir la protrombina (II) en trombina (IIa). El FT se prefiere porque es el mismo activador que se encuentra en el cuerpo para la vía extrínseca. Accionadores para la vía intrínseca son, por ejemplo, superficies como el vidrio, el caolín, la sílice o el ácido elágico. En una forma de realización, el método según la presente descripción comprende:

15

20

- permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina;
- permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina;
- y
- permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina tras producir un cuanto de luz.

25

[0039] En una forma de realización, el método de la invención comprende: permitir que un iniciador de la vía intrínseca genere, en presencia del factor VII(a), el factor Xa o el factor IXa, permitir que el factor IXa genere el factor Xa, permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina; permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina con la producción de un cuanto de luz.

30

[0040] En una forma de realización, el método de la presente descripción comprende: permitir que un iniciador de la vía intrínseca genere el factor XIIa, permitir que el factor XIIa genere el factor XIa, permitir que el factor XIa genere el factor IXa, permitir que el factor IXa genere el factor Xa, permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina; permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina con la producción de un cuanto de luz.

35

[0041] La molécula activadora para inducir la generación de plasmina se puede seleccionar del grupo que consiste en uroquinasa, estreptoquinasa y activador tisular del plasminógeno, y es preferiblemente el activador tisular del plasminógeno. La molécula activadora se puede aislar naturalmente o se puede producir por metodología recombinante. Así, el grupo de moléculas activadoras comprende también uroquinasa recombinante, estreptoquinasa recombinante y activador tisular del plasminógeno recombinante. La plasmina se forma por activación de la proenzima, el plasminógeno, por activadores del plasminógeno. Los activadores tisulares del plasminógeno se encuentran en muchos tejidos. El activador tisular del plasminógeno es liberado por las células endoteliales y las plaquetas activadas. La molécula activadora para inducir la generación de plasmina en el ensayo de la invención es adecuadamente el activador tisular del plasminógeno (tPA), debido a que también es el activador en la situación natural en el cuerpo. Ejemplos de otros accionadores son la uroquinasa y la estreptoquinasa.

40

45

[0042] En una forma de realización, el método de la invención comprende: permitir que la uroquinasa, la estreptoquinasa o el tPA convierta el plasminógeno en plasmina, opcionalmente en presencia de fibrina o fragmentos de fibrina; permitir que la plasmina convierta el sustrato de plasmina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina tras producir un cuanto de luz.

50

[0043] En una forma de realización, el método de la invención incluye: i) la conversión de protrombina en trombina por el factor Xa; la conversión del factor X en el factor Xa por el complejo FT-factor VIIa o el complejo de factor IXa y factor-VIII(a); la conversión del factor VII en el factor VIIa por el complejo FT-factor-VIIa; la conversión del plasminógeno en la plasmina por el tPA o la uPA o la estreptoquinasa o con una eficacia inferior por los factores intrínsecos el factor XIIa, el factor XIa y la calicreína; la conversión del factor IX en el factor IXa por el complejo FT-

55

VIIa o por el factor XIa; la conversión del factor XI en el factor XIa por el factor XIIIa o la trombina; la conversión del factor XII en el factor XIIIa por la precalicreína o el factor XIIIa; la conversión de la precalicreína en la calicreína por vidrio, caolín, sílice o ácido elálgico; la conversión de la proteína C en la proteína C activada por el complejo de trombina-trombomodulina; la conversión del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina en inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado, por la trombina o el complejo de trombina-trombomodulina; la conversión de tPA monocatenario (sc-tPA) en tPA bicatenario (tc-tPA) por la plasmina o con una eficacia inferior por el factor Xa y la calicreína; la conversión de uPA monocatenario en uPA bicatenario por la plasmina o con una eficacia inferior por el factor XIIIa y la calicreína; ii) la conversión de un sustrato específico para el factor hemostático generado en aminoluciferina por la plasmina formada en i); y iii) la conversión de la aminoluciferina en amino-oxiluciferina por la luciferasa, tras lo cual se produce un fotón único con una eficiencia cuántica elevada (Cosby et al. 2007. Cell notes. n.º 18: 9-11). Manteniendo constantes las concentraciones de todos los componentes en la reacción, excepto el factor hemostático de interés, la intensidad de la luz es proporcional a la concentración de dicho factor hemostático.

[0044] Los sustratos quimioluminiscentes descritos en el primer aspecto de la invención se proporcionan en un aspecto adicional de la invención como tales.

[0045] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de ensayo, que comprende un primer recipiente que contiene un sustrato de plasmina quimioluminiscente según la invención, y uno, dos, tres o más recipientes adicionales donde cada recipiente comprende un reactivo distinto seleccionado del grupo que consiste en luciferasa, ATP, una fuente de Mg²⁺ y una molécula activadora para inducir la generación de plasmina.

[0046] La molécula activadora para inducir la generación de plasmina se puede seleccionar del grupo que consiste en uroquinasa, estreptoquinasa y activador tisular del plasminógeno (tPA).

[0047] El kit puede comprender además una superficie que contiene fosfolípidos aniónicos y/o fibrina, un fragmento de fibrina o una sustancia generadora de fibrina.

[0048] El kit puede también comprender además un recipiente con uno o más iniciadores de la coagulación como se ha descrito anteriormente.

[0049] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para referirse a que se incluyen los artículos posteriores a la palabra, pero no se excluyen los artículos no específicamente mencionados. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" refiriéndose a que una composición de la invención puede comprender componente(s) adicional(es) a aquellos específicamente identificados, sin alterar dicho(s) componente(s) adicional(es) las características únicas de la invención.

[0050] Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" se refiere por tanto normalmente a "al menos uno/a".

EJEMPLOS

Ejemplo 1: características de dos sustratos típicos (los sustratos de trombina y el uso de los mismos en la generación de trombina no forman parte de la presente invención)

El ensayo quimioluminiscente para medir la generación de trombina en plasma

[0051] En una placa de 96 pocillos (volumen final 120 µl), se añadieron los componentes siguientes:

- 80 µl de plasma normal mezclado (NPP),
- 2 µl de cefalina (número de producto de Roche 524298; disuelta en 1 ml de agua destilada) 2 µl de factor tisular (Innovin, Siemens Healthcare Diagnostics, diluido 500x),
- 10 µl de sal de TFA de MeO-(CH₂CH₂O)₂-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina (sustrato específico de la trombina (10 mM)) o sal de TFA de piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina (sustrato específico de la plasmina (10 mM))
- 2 µl de tPA recombinante (Actilyse®, Boehringer Ingelheim, 193 IU/ml),
- 2 µl de luciferasa (Sigma, 72 µg/ml),
- 2 µl de ATP (Sigma, 0,33 mM),

2 µl de MgCl₂ (8,3 mM)
14 µl de tampón de TRIS/NaCl (50 mM TRIS y 150 mM NaCl, pH 7,4).

5 [0052] Esta mezcla reactiva se mezcló, seguido de la adición de 4 µl de tampón de TRIS/NaCl con Ca²⁺ para iniciar la generación de trombina. Concentración final 16,7 mM. El resultante se mezcló rápidamente, y se controló la generación de trombina en un Fluostar. Los ajustes del Fluostar fueron: 140 ciclos de 30 segundos, ganancia: máximo = 4095. Antes de medir, se cogieron 25 µl de la mezcla reactiva del pocillo con un volumen total de 120 µl. Esto se pipeteó en una placa de microtitulación de 384 pocillos adecuada para medir la luminiscencia. La medición se comenzó inmediatamente. La luminiscencia se representa en unidades relativas de luminiscencia (RLU).

Sustratos:

10 [0053] Los sustratos usados para evaluar este ensayo de luminiscencia fueron un sustrato específico de la trombina (S1: sal de TFA de MeO-(CH₂CH₂O)₂-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina) y un sustrato específico de la plasmina (S2: sal de TFA de piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina).

Experimentos

15 [0054] La reactividad del S1 y el S2 se determinó en tampón y en plasma. Las mediciones se realizaron bajo las condiciones de ensayo expuestas anteriormente a menos que se indique lo contrario mediante experimentos individuales.

Resultados:

20 [0055] La figura 1 demuestra la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S1 (Fig. 1a) usando 150 nM de trombina (continua) y 40 nM de plasmina (rayada) y la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S2 (Fig. 1b) usando 4 nM de plasmina (rayada) y 15 nM de trombina (continua) en el tampón de TBS con las concentraciones de luciferasa, ATP, MgCl₂ y CaCl₂ descritas anteriormente. Estos resultados indican que los sustratos son más susceptibles a su respectiva enzima.

25 [0056] La figura 2 demuestra la intensidad de la luminiscencia del sustrato de trombina S1 (Fig. 2a) o el sustrato de plasmina S2 (Fig. 2b) en plasma normal mezclado sin tPA (continua), con tPA (rayada) y en plasma deficitario en FVIII incubado con tPA (punteada).

[0057] La figura 3 demuestra el efecto del magnesio en la conversión del S1 (Fig. 3a) y el S2 (Fig. 3b) en un ensayo estándar con plasma normal mezclado con una concentración final de 8,3 mM (continua), 0,83 mM (rayada) y sin magnesio (punteada).

Ejemplo 2: varios sustratos evaluados con plasmina y trombina.

30 [0058] Se analizaron varios sustratos usando trombina y plasmina. El ensayo se realizó esencialmente como se describe en el ejemplo 1. Sin embargo, en vez de plasma, se añadieron plasmina o trombina en concentraciones finales de 30 nM (trombina) o 40 nM (plasmina).

[0059] En la tabla 1 se representan los resultados para los varios sustratos. Como se puede observar claramente, la plasmina y la trombina inducen señales de luminiscencia específicas.

Sustrato	RLU de trombina	RLU de plasmina	RLU de trombina/RLU de plasmina
CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ -acetil-Phe-Arg-aminoluciferina ·TFA	300946	759874	0,40
CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ O) ₄ -acetil-Phe-Arg-aminoluciferina ·TFA	340768	1282351	0,27
PyroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina ·TFA	139546	1999875	0,07
H-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina ·2TFA	292161	62387	4,7
Cbz-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina ·TFA*	771302	146486	5,3
CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ -acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina ·TFA	814171	251299	3,2

CH ₃ O-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina · TFA	925567	294631	3,1
CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ O) ₄ -acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina · TFA	293198	134983	2,2
* solubilidad muy baja en tampón + DMSO al 10%; no soluble en tampón sin DMSO			

Leyendas de las figuras

[0060]

5 La figura 1 representa la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S1 (sal de TFA de CH₃O-(CH₂CH₂O)₂-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina) (Fig. 1a) usando 150 nM de trombina (línea continua) y 40 nM de plasmina (línea rayada) y la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S2 (sal de TFA de piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina) (Fig. 1b) usando 4 nM de plasmina (línea rayada) y 15 nM de trombina (línea continua) en tampón salino tamponado con tris (TBS) con las concentraciones de luciferasa, ATP, MgCl₂ y CaCl₂ descritas anteriormente. Estos resultados indican que los sustratos son más susceptibles a su respectiva enzima.

10 La figura 2 representa la intensidad de la luminiscencia del sustrato de trombina S1 (Fig. 2a) o el sustrato de plasmina S2 (Fig. 2b) en el plasma normal mezclado sin tPA (continua), con tPA (rayada) y en plasma deficitario en FVIII incubado con tPA (punteada).

15 La figura 3 representa el efecto del magnesio en la conversión del S1 (Fig. 3a) y el S2 (Fig. 3b) en un ensayo estándar con plasma normal mezclado con una concentración final de 8,3 mM (continua), 0,83 mM (rayada) y sin magnesio (punteada).

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar *in vitro* la generación de un factor hemostático en una muestra de ensayo que comprende determinar la cantidad de dicho factor hemostático generado usando un sustrato quimioluminiscente que es específico para dicho factor hemostático, donde una molécula luminiscente es liberada de dicho sustrato quimioluminiscente por dicho factor hemostático, donde dicha molécula luminiscente se convierte posteriormente para producir un cuanto de luz detectable, donde dicho factor hemostático es la plasmina y donde el sustrato quimioluminiscente es un sustrato seleccionado del grupo que consiste en:
- CH₃O-(CH₂CH₂O)_n-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina donde n está en el intervalo de 2-5;
 - CH₃O-(CH₂CH₂O)₂-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina;
 - CH₃O-(CH₂CH₂O)₄-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina;
 - piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina; y,
 - una sal de un sustrato de los anteriores, preferiblemente la sal de TFA.
2. Método según la reivindicación 1 que comprende:
- proporcionar una mezcla reactiva que comprende una muestra de ensayo que va a evaluarse, una molécula activadora para inducir la generación de dicho factor hemostático, un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor hemostático; y
 - determinar la cantidad de dicho factor hemostático generado midiendo una señal luminiscente.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la mezcla reactiva comprende además una luciferasa capaz de convertir la aminoluciferina en amino-oxiluciferina, y ATP y comprende además preferiblemente Mg²⁺.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre total, líquido de drenaje, plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde la molécula activadora para inducir la generación de plasmina se selecciona del grupo que consiste en uroquinasa, estreptoquinasa y activador tisular del plasminógeno, y es preferiblemente el activador tisular del plasminógeno.
6. Método según la reivindicación 6, que comprende:
- permitir que la uroquinasa, la estreptoquinasa o el tPA convierta el plasminógeno en plasmina;
 - permitir que la plasmina convierta el sustrato de plasmina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina;
 - y
 - permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina tras producir un cuanto de luz.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde determinar la cantidad de dicho factor hemostático generado midiendo una señal luminiscente no implica calcular la primera derivada de dicha señal luminiscente.
8. Sustrato quimioluminiscente seleccionado del grupo que consiste en:
- CH₃O-(CH₂CH₂O)_n-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina, donde n está en el intervalo de 2-5;
 - CH₃O-(CH₂CH₂O)₂-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina;
 - CH₃O-(CH₂CH₂O)₄-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina;
 - piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina; y,
 - una sal de un sustrato de los anteriores, preferiblemente la sal de TFA.
9. Kit para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de ensayo, que comprende un primer recipiente que contiene un sustrato quimioluminiscente según la reivindicación 8, y uno o más recipientes adicionales que contiene cada uno un reactivo distinto seleccionado del grupo que consiste en luciferasa, ATP, una fuente de Mg²⁺ y una molécula activadora para inducir la generación de plasmina.

Fig 1a

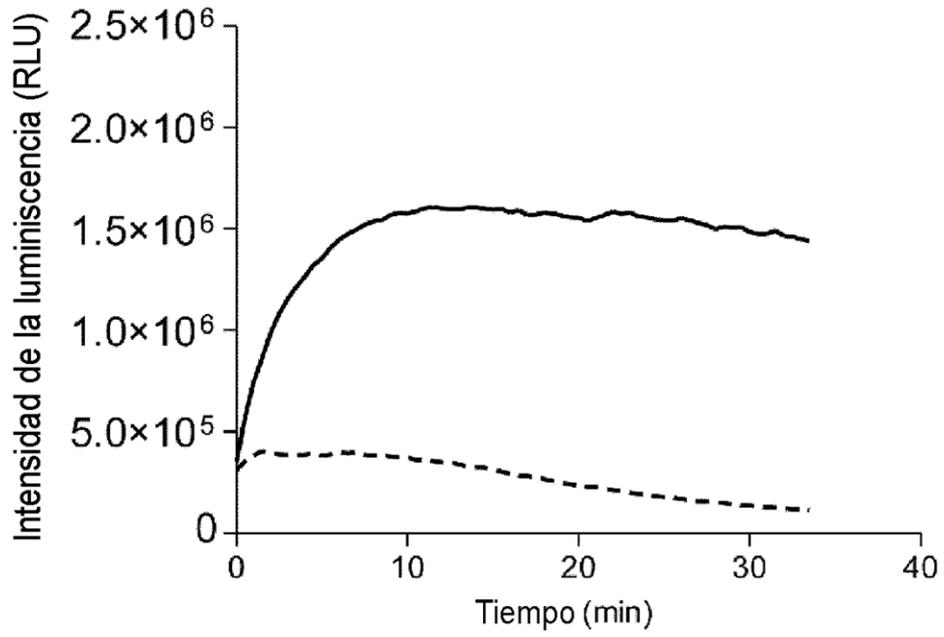


Fig 1b

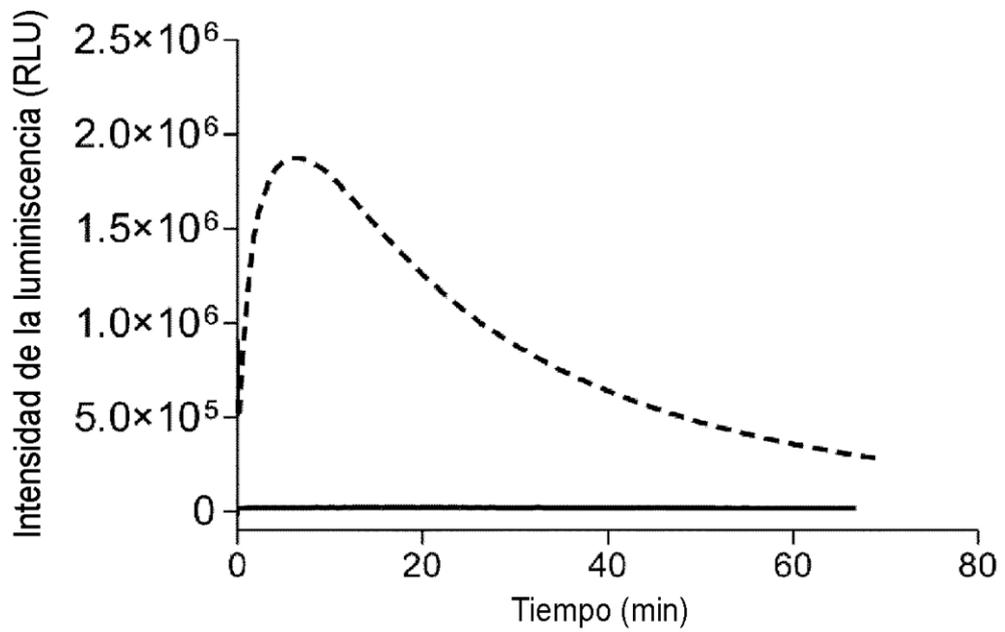


Fig 2a

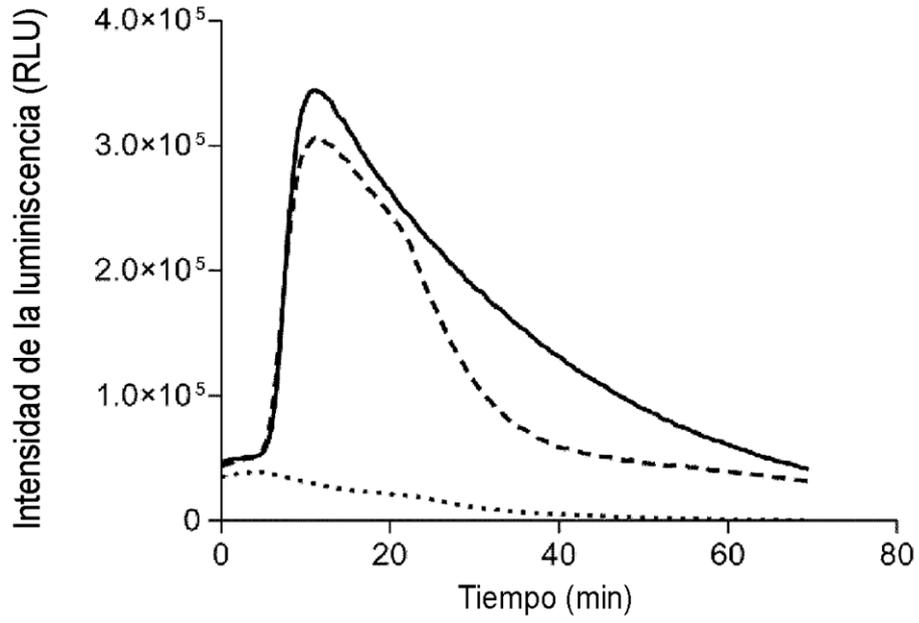


Fig 2b

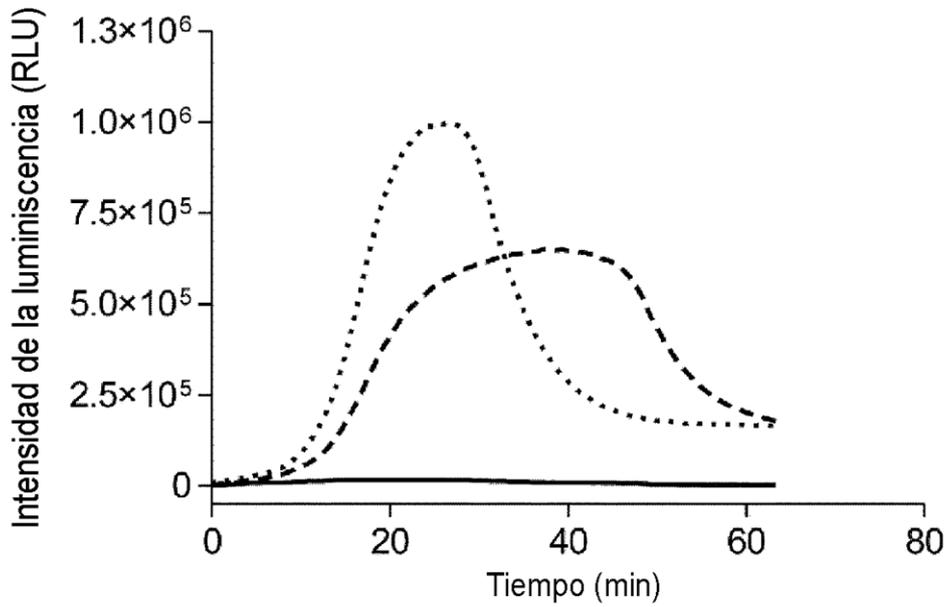


Fig 3a

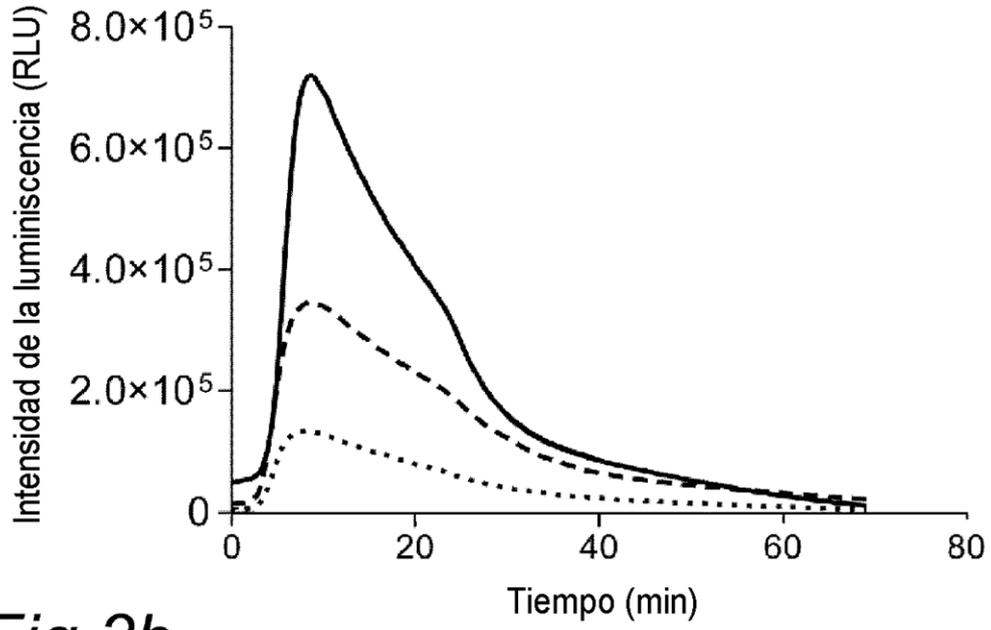


Fig 3b

