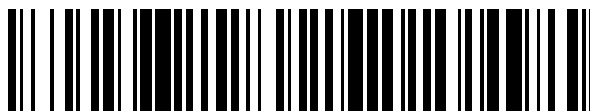


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 009**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2018 PCT/EP2018/082632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019 WO19105907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2018 E 18815546 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3538898**

54 Título: **Reactivo de tiempo de protrombina que contiene un quelante de hierro**

30 Prioridad:

28.11.2017 EP 17204000

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

09.07.2020

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**PILGRIM, SABINE;
WISSEL, THOMAS y
ZANDER, NORBERT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 773 009 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

Reactivo de tiempo de protrombina que contiene un quelante de hierro

5 La presente invención corresponde al campo del diagnóstico de coagulación, y hace referencia a un reactivo de tiempo de protrombina en base a la proteína del factor tisular recombinante o nativa y fosfolípidos, que se puede estabilizar mediante la adición de un quelante de hierro seleccionado del grupo sideróforo y 3,5-difenil-1,2,4-triazol.

10 La proteína del factor tisular (abreviado: factor tisular o tromboplastina, del inglés: tissue factor) es una proteína transmembrana con esencial importancia para la coagulación de la sangre. Es expresada por células que normalmente no están en contacto con el flujo sanguíneo como, por ejemplo, de células en el subendotelio (musculatura lisa) y de células que rodean los vasos sanguíneos (por ejemplo, fibroblastos). Sin embargo, en caso de defectos en los vasos sanguíneos, las células que expresan proteínas del factor tisular entran en contacto con el factor VII, un factor de coagulación sanguínea procoagulante que circula en la sangre. En presencia de calcio, la proteína del factor tisular y el factor VII forman un complejo, y la actividad del factor VII se multiplica por mil ($F VII > F VIIa$). El complejo de proteína de factor tisular y factor VIIa cataliza la conversión del factor X de factor de coagulación sanguíneo inactivo en factor Xa activado en presencia de fosfolípidos y calcio y, por lo tanto, acelera el proceso de coagulación. Junto con el factor VII, el factor tisular conforma la así denominada como vía extrínseca de la coagulación de la sangre, que tiene la función de evitar un daño de los vasos sanguíneos mediante una coagulación de la sangre lo más rápida posible.

20 En el diagnóstico de la coagulación se han desarrollado diversos procedimientos de pruebas in vitro, con la ayuda de los cuales se puede determinar si la sangre o el plasma de un paciente puede coagular adecuadamente, o si existe un trastorno de coagulación. En el caso de un trastorno de coagulación, generalmente resulta necesario conocer con precisión la causa de la deficiencia existente, para poder seleccionar las medidas terapéuticas más adecuadas. La proteína del factor tisular se usa como un activador para investigar diferentes subfunciones de la coagulación sanguínea, en particular, para examinar el sistema extrínseco de la coagulación sanguínea. El uso más conocido de la proteína de factor tisular como activador de la coagulación es la prueba rápida (del inglés Quick-Test) para determinar el tiempo de protrombina (PT, por sus siglas en inglés) (sinónimo: tiempo de Tromboplastina). En la prueba rápida y sus variantes, generalmente, una muestra de plasma se mezcla con una mezcla de proteína de factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, y el tiempo desde el momento de la mezcla hasta la formación de fibrina detectable se mide en segundos. En las pruebas de coagulación, en las que se usan sustratos cromogénicos, alternativamente se mide el tiempo desde el momento de la mezcla hasta que se alcanza un determinado cambio en la absorbancia. La proteína del factor tisular también se usa en otros métodos de prueba que no sirven para determinar el tiempo de coagulación, sino para determinar los componentes individuales del sistema de coagulación como, por ejemplo, el potencial de trombina endógena (ETP) (EP-A2-420332). En principio, la proteína de factor tisular se puede usar en todas las pruebas que se ocupan de los componentes de la coagulación extrínseca.

35 El reactivo de tiempo de protrombina (reactivo de factor tisular, reactivo PT) tiene una importancia central para la respectiva prueba. Un reactivo de tiempo de protrombina generalmente contiene el factor tisular junto con fosfolípidos activos en la coagulación. La proteína de factor tisular se obtiene como un extracto tisular de diferentes órganos (por ejemplo, cerebro, placenta, pulmones) de diferentes especies (por ejemplo, conejo, humano, vaca) o se produce de forma recombinante. En el estado del arte se conocen numerosos métodos para obtener proteína de factor tisular y para producir reactivos de tiempo de protrombina, y se encuentran disponibles comercialmente una variedad de reactivos de tiempo de protrombina.

45 La mayoría de los reactivos de tiempo de protrombina disponibles comercialmente están disponibles actualmente en forma liofilizada y, por lo tanto, deben disolverse en un medio de reconstitución, por ejemplo, en agua destilada o en una disolución tampón. La razón de ello es la baja estabilidad de los reactivos en estado líquido. La desventaja de los reactivos que se proporcionan en forma liofilizada no consiste solamente en que los fabricantes y los usuarios deben realizar pasos de procedimiento adicionales que exigen mucho tiempo y costes (liofilización y reconstitución), sino también en que estas medidas adicionales implican el riesgo de que se produzcan errores que pueden afectar la calidad del reactivo. Por lo tanto, son deseables las formulaciones de reactivos líquidos, ya listas para usar. Sin embargo, un problema en la provisión de reactivos líquidos de tiempo de protrombina es su escasa estabilidad. Por estabilidad de un reactivo de tiempo de protrombina, se puede entender, por ejemplo, la conservación del tiempo de protrombina para un plasma definido, por ejemplo, un plasma normal, durante el tiempo de almacenamiento. De manera ideal, un reactivo de tiempo de protrombina debe conservar sus especificaciones durante la duración de su almacenamiento o uso, o, en el mejor de los casos, las mismas propiedades y características como al momento de su producción.

55 En el estado del arte están descritas diversas estrategias para la estabilización de los reactivos líquidos de tiempo de protrombina. En la solicitud EP-A2-942284 se describe un reactivo de tiempo de protrombina líquido basado en factor tisular recombinante que se estabiliza mediante la adición combinada de ácido ascórbico y una seroalbúmina. En la solicitud US 3,522,148 se describe un reactivo líquido de tiempo de protrombina que contiene proteína de

factor tisular (natural) extraída de tejido, el cual se estabiliza mediante la adición de determinadas sales de sodio o calcio. En la solicitud EPA1- 585987 se describe otro reactivo líquido de tiempo de protrombina basado en la proteína de factor tisular natural, que se estabiliza mediante la adición de diferentes estabilizadores, como la albúmina o el polietilenglicol, así como diversas sustancias antimicrobianas activas, como azida de sodio o antibióticos. En la solicitud EP-A2-524803 se describe un procedimiento para la producción de un reactivo de tiempo de protrombina en el cual se usa un quelante de iones metálicos, en particular, EDTA o EGTA, en la extracción del factor tisular y puede estar contenido en el reactivo terminado. La cantidad de iones de calcio unidos por el quelante de iones metálicos se reemplaza por la adición de sal de calcio adicional.

En la solicitud US 2017/0234895 A1 está descrito un set de dos piezas para la preparación de un reactivo de tiempo de protrombina líquido ya listo para usar, que en un primer recipiente contiene una primera solución que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos y en un segundo recipiente contiene una solución de cloruro de calcio. En la primera solución está contenido un quelante de calcio para la estabilización. Las dos soluciones son mezcladas por el usuario sólo justo antes de ser utilizadas. Aunque en este caso el fabricante puede prescindir de la liofilización y el usuario de la reconstrucción de un reactivo liofilizado, de todas maneras, el usuario aún debe mezclar los dos líquidos entre sí para obtener el reactivo de tiempo de protrombina listo para usar.

Por lo expuesto, el objeto de la presente invención consistió en proporcionar un reactivo de tiempo de protrombina listo para usar que sea estable para el almacenamiento en estado líquido, que contenga al menos proteína de factor tisular y fosfolípidos y que opcionalmente también pueda contener iones de calcio.

Se ha encontrado que la adición de un quelante de hierro, en particular, un quelante de hierro del grupo sideróforo y particularmente la adición de deferoxamina, pioverdina o ferricromo, o la adición de un quelante de hierro del grupo de 3,5-difenil-1,2,4-triazoles y, particularmente, la adición de deferasirox, aumenta la estabilidad de una solución acuosa que contiene factor tisular y fosfolípidos y, opcionalmente, iones de calcio. Los reactivos de tiempo de protrombina estabilizados según la invención y almacenados en estado líquido proporcionan resultados de medición del tiempo de protrombina (PT), incluso después de 10 semanas de almacenamiento a +37° C, que se desvían menos del 20% del resultado de la medición de PT al comienzo del tiempo de ejecución. Un almacenamiento forzado a +37° C durante 10 semanas se usa para evaluar rápidamente si se puede esperar una estabilidad de almacenamiento de +2° C a +8° C durante un período de 12 meses o más. Cuando un reactivo de tiempo de protrombina estabilizado, en un almacenamiento a +37° C durante un período de 10 semanas, proporciona resultados de medición del tiempo de protrombina (PT) que se desvían menos del 20% del resultado de la medición de PT al comienzo del tiempo de ejecución, es esperable que el reactivo sea estable a una temperatura de almacenamiento de +2° C a +8° C durante un período de 12 meses o más.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención consiste en un reactivo de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos, y que además contiene al menos un quelante de hierro, en donde al menos un quelante de hierro se selecciona del grupo de un sideróforo y de un 3,5-difenil-1,2,4-triazol.

Los sideróforos son una clase de agentes quelantes que se unen al hierro, los cuales están formados por microorganismos como bacterias y hongos y por plantas y que presentan una alta afinidad por los iones de hierro III (iones Fe³⁺). Los sideróforos preferidos son los sideróforos del grupo de los hidroxamatos hexadentados como, por ejemplo, deferoxamina, ferricromo y ferricrocina.

Preferentemente, el quelante de hierro se selecciona del grupo de los sideróforos del grupo la deferoxamina, pioverdina y el ferricromo.

En una forma de ejecución, un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención contiene el quelante de hierro deferoxamina del grupo de los hidroxamatos hexadentados (sinónimo: desferrioxamina; nombre comercial: Desferal), que está formado, por ejemplo, a partir de la bacteria *Streptomyces pilosus*.

En otra forma de ejecución, un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención contiene el quelante de hierro pioverdina, un péptido no ribosómico que está formado, por ejemplo, por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y se clasifica en el grupo de los sideróforos hexadentados mixtos de tipo hidroxamato y catecolato. Otros quelantes de hierro adecuados del grupo de los sideróforos hexadentados mixtos del tipo hidroxamato y catecolato son, por ejemplo, enterobactina y yersiniabactina.

En otra forma de ejecución, un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención contiene el quelante de hierro ferricromo, un hexapéptido cíclico que contiene tres residuos de glicina y ornitina hidrolizada y acetilada (sinónimo: deferriferricromo), que está formado, por ejemplo, por el hongo *Ustilago sphaerogena* y también se clasifica en el grupo de hidroxamatos hexadentados.

Los 3,5-difenil-1,2,4-triazoles son una clase de agentes quelantes que se enlazan al hierro y que entre otros fueron desarrollados con fines terapéuticos (EP-B1-0914118). Los 3,5-difenil-1,2,4-triazoles preferidos son deferasirox, etil[3,5-bis(2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato y 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol.

5 En una correspondiente forma de ejecución, un reactivo de tiempo de protrombina según la invención contiene un quelante de hierro del grupo 3,5-difenil-1,2,4-triazoles y, entre ellos, particularmente, deferasirox (nomenclatura IUPAC: ácido 4-[(3Z,5E)-3,5-bis(6-oxociclohexa-2,4-dien-1-ilideno)-1,2,4-triazolidin-1-il]benzoico), Etil[3,5-bis(2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato o 3,5-Bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol.

10 Un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención contiene preferentemente uno de los quelantes de hierro adecuados mencionados anteriormente en una concentración de 0,007 a 2,5 mmol/L, de manera particularmente preferida de 0,01 a 0,5 mmol/L.

Un reactivo de tiempo de protrombina de acuerdo con la invención puede contener uno solo de los quelantes de hierro adecuados mencionados anteriormente, o una combinación de dos, tres, cuatro o más de ellos.

15 En una forma de ejecución particularmente preferida, un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención también contiene iones de calcio. Para ello, el reactivo de tiempo de protrombina puede contener cloruro de calcio, preferentemente en una concentración de 5 a 500 mmol/L.

La proteína de factor tisular contenida en el reactivo de tiempo de protrombina se selecciona preferentemente del grupo de la proteína de factor tisular recombinante humana o animal (por ejemplo, conejo, vaca, etc.) o la proteína de factor tisular natural humana o animal a partir de un extracto de tejido (por ejemplo, del cerebro, de la placenta, del pulmón, etc.).

20 Los fosfolípidos pueden provenir de fuentes naturales y/o sintéticas.

Aunque la ventaja particular de la presente invención consiste en que un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención puede almacenarse como un reactivo líquido listo para usar, por supuesto, también es posible que el reactivo se proporcione como un liofilizado que puede reconstituirse en agua o en una solución tampón.

25 Otro objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para la preparación de un reactivo líquido de tiempo de protrombina, en donde se proporciona un líquido que contiene proteína de factor tisular, fosfolípidos y al menos un quelante de hierro seleccionado del grupo sideróforo, entre ellos preferentemente, deferoxamina, pioverdina o ferricromo; y 3,5-difenil-1,2,4-triazol, entre ellos preferentemente deferasirox, etil[3,5-bis(2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato o 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol, y el líquido se vierte en un
30 recipiente de reactivo sin que el mismo se liofilice.

Otro objeto de la presente invención también consiste en un procedimiento para la estabilización de un reactivo de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos y opcionalmente iones Ca^{2+} , en donde al reactivo se adiciona al menos un quelante de hierro seleccionado del grupo sideróforo, preferentemente, deferoxamina, pioverdina y ferricromo; y 3,5-difenil-1,2,4-triazol, preferentemente, deferasirox, etil [3,5-bis(2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato ó 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol .
35

De manera preferida, en el procedimiento de estabilización conforme a invención, el quelante de hierro se adiciona en una cantidad tal, de modo que finalmente el reactivo contiene el quelante de hierro en una concentración de 0,007 a 2,5 mmol/L, de manera particularmente preferida de 0,01 a 0,5 mmol/L.

40 Otro objeto de la presente invención consiste en el uso de un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención en un procedimiento in vitro para la determinación de un parámetro de coagulación en una muestra de un paciente, particularmente para la determinación de un parámetro de coagulación del grupo de tiempo de protrombina (PT, también prueba rápida) y sus variantes, fibrinógeno derivado del tiempo de protrombina y potencial de trombina endógena (ETP). El reactivo conforme a la invención es adecuado para el uso como activador de la cascada de coagulación, por ejemplo, en métodos de prueba que se basan en la detección de un coágulo de fibrina, así como
45 también en métodos de prueba cromogénicos o fluorogénicos.

La invención también hace referencia a un procedimiento para la determinación de un parámetro de coagulación en una muestra de plasma, en donde la muestra de plasma se mezcla con un reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención para obtener una mezcla de reacción y en la mezcla de reacción se determina el parámetro de coagulación. El parámetro de coagulación puede ser, por ejemplo, el tiempo de protrombina o el potencial de trombina endógena de una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre total o plasma humanos.
50

Para la determinación del tiempo de protrombina, preferentemente, se mide fotométricamente el cambio en la absorbancia de la mezcla de reacción y se determina el tiempo desde el momento de la mezcla del reactivo de tiempo de protrombina conforme a la invención con la muestra de plasma hasta que se alcanza un valor umbral.

5 Para derivar la concentración de fibrinógeno a partir de la determinación del tiempo de protrombina ("fibrinógeno derivado"), se mide fotométricamente el aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción; la misma se correlaciona con la concentración de fibrinógeno.

10 La presente invención también hace referencia al uso de un quelante de hierro para la preparación de un reactivo de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos, en donde el quelante de hierro se selecciona del grupo de un sideróforo y de un 3,5-difenil-1,2,4-triazol. Preferentemente, los quelantes de hierro utilizados del grupo sideróforo se seleccionan del grupo la deferoxamina, pioverdina y el ferricromo. Preferentemente, los quelantes de hierro utilizados del grupo 3,5-difenil-1,2,4-triazol se seleccionan del grupo de deferasirox, etil [3,5-bis (2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato y 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol.

Descripción de las figuras

15 Figura 1

muestra el cambio de los tiempos de protrombina en segundos (PT [s]) del plasma de control normal Ci-Trol 1 con los reactivos PT estabilizados con deferoxamina (9 = 9 mg/L = 0,0137 mM deferoxamina; 12 = 12 mg/L = 0,0183 mM deferoxamina; 15 = 15 mg/L = 0,0228 mM deferoxamina) en comparación con el reactivo PT no estabilizado sin deferoxamina (0 = 0 mg/L = 0 mM deferoxamina) y con el reactivo de referencia (R) almacenado liofilizado disuelto en el correspondiente momento, a lo largo del tiempo (t) en semanas. Los reactivos se almacenaron a una temperatura de 37° C.

Figura 2

25 muestra el cambio de los tiempos de protrombina en segundos (PT [s]) del plasma de control anormal Ci-Trol 2 con los reactivos PT estabilizados con deferoxamina (9 = 9 mg/L = 0,0137 mM deferoxamina; 12 = 12 mg/L = 0,0183 mM deferoxamina; 15 = 15 mg/L = 0,0228 mM deferoxamina) en comparación con el reactivo PT no estabilizado sin deferoxamina (0 = 0 mg/L = 0 mM deferoxamina) y con el reactivo de referencia (R) almacenado liofilizado disuelto en el correspondiente momento, a lo largo del tiempo (t) en semanas. Los reactivos se almacenaron a una temperatura de 37° C.

Figura 3

30 muestra el cambio de los tiempos de protrombina en segundos (PT [s]) del plasma de control normal Ci-Trol 1 con los reactivos PT estabilizados con deferoxamina (15 = 15 mg/L = 0,0228 mM deferoxamina; 75 = 75 mg/L = 0,114 mM deferoxamina; 150 = 150 mg/L = 0,228 mM deferoxamina) en comparación con el reactivo PT no estabilizado sin deferoxamina (0 = 0 mg/L = 0 mM deferoxamina), a lo largo del tiempo (t) en semanas. Los reactivos se almacenaron a una temperatura de 37° C.

35 Figura 4

40 muestra el cambio de los tiempos de protrombina en segundos (PT [s]) del plasma de control anormal Ci-Trol 2 con los reactivos PT estabilizados con deferoxamina (15 = 15 mg/L = 0,0228 mM deferoxamina; 75 = 75 mg/L = 0,114 mM deferoxamina; 150 = 150 mg/L = 0,223 mM deferoxamina) en comparación con el reactivo PT no estabilizado sin deferoxamina (0 = 0 mg/L = 0 mM deferoxamina) a lo largo del tiempo (t) en semanas. Los reactivos se almacenaron a una temperatura de 37° C.

Los siguientes ejemplos de ejecución tienen la función de ilustrar la presente invención y no se deben entender como una limitación.

EJEMPLO 1: Determinación de la estabilidad de un reactivo líquido de tiempo de protrombina estabilizado con deferoxamina

45 En el tiempo t_0 , a un reactivo de tiempo de protrombina líquido, que contenía proteína de factor tisular recombinante humana, fosfolípidos sintéticos e iones de calcio se añadió en diferentes lotes deferoxamina (sal de mesilato de deferoxamina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) en la concentración final indicada:

1. 0 mM deferoxamina

2. 0,0137 mM (9 mg/L) deferoxamina
3. 0,0183 mM (12 mg/L) deferoxamina
4. 0,0228 mM (15 mg/L) deferoxamina
5. 0,114 mM (75 mg/L) deferoxamina
- 5 6. 0,228 mM (150 mg/L) deferoxamina

Los diferentes reactivos fueron utilizados en una prueba automática de tiempo de protrombina (prueba PT) en un dispositivo de análisis Sysmex® CA-1500 (Sysmex Corp., Kobe, Japón). Como muestras se usaron los siguientes plasmas de control definidos:

10 • plasma de control Dade® Ci-Trol® control de la coagulación nivel 1 (Ci-Trol 1); control normal para la determinación del tiempo de protrombina; los resultados son comparables con aquellos con plasma de citrato normal fresco;

• plasma de control Dade® Ci-Trol® control de la coagulación nivel 2 (Ci-Trol 2); control anormal para la determinación del tiempo de protrombina como se observa en los trastornos de coagulación; los tiempos de coagulación son más prolongados en comparación con aquellos con plasma de citrato normal fresco.

15 La muestra y el reactivo fueron respectivamente precalentados a 37° C y finalmente mezclados. Mediante la adición del reactivo se desencadenó el proceso de coagulación y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo de fibrina (tiempo de protrombina en segundos).

20 Para la determinación de la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos se almacenaron en estado líquido en botellas de vidrio selladas con un tapón a +37° C durante un período de 16-18 semanas. Aproximadamente cada dos semanas se extrajeron muestras de los reactivos y se determinó el tiempo de protrombina del mismo plasma de referencia. Como reactivo de referencia, en cada momento se reconstituyó con agua destilada y se midió un reactivo de tiempo de protrombina liofilizado (reactivo Dade® Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Alemania).

25 En la Figura 1 (Ci-Trol 1 como muestra) y en la Figura 2 (Ci-Trol 2 como muestra) se muestran los tiempos de protrombina de los diferentes reactivos de tiempo de protrombina (0, 12, 15 mg/L deferoxamina) durante un período de 16 semanas a +37° C. Los tiempos de protrombina estables durante un período de al menos 10 semanas con desviaciones de menos del 20% en comparación con el valor inicial en el tiempo t_0 sólo se lograron con el reactivo de referencia (R) liofilizado y disuelto respectivamente fresco y con los reactivos de tiempo de protrombina estabilizados con deferoxamina conforme a la invención. El reactivo almacenado líquido sin deferoxamina proporcionó como máximo después de 4 semanas sólo tiempos de protrombina notablemente divergentes.

35 En la Figura 3 (Ci-Trol 1 como muestra) y en la Figura 4 (Ci-Trol 2 como muestra) se muestran los tiempos de protrombina de los diferentes reactivos de tiempo de protrombina (15, 75, 150 mg/L deferoxamina) durante un período de 18 semanas a +37° C. Los tiempos de protrombina estables durante un período de al menos 10 semanas con desviaciones de menos del 20% en comparación con el valor inicial en el tiempo t_0 sólo se lograron con los reactivos de tiempo de protrombina estabilizados con deferoxamina conforme a la invención. El reactivo almacenado líquido sin deferoxamina proporcionó como máximo después de 4 semanas sólo tiempos de protrombina notablemente divergentes.

EJEMPLO 2: Determinación de la estabilidad de los reactivos líquidos de tiempo de protrombina estabilizados con diferentes quelantes de hierro.

40 En el tiempo t_0 , a un reactivo de tiempo de protrombina líquido, que contenía proteína de factor tisular recombinante humana, fosfolípidos sintéticos e iones de calcio se añadió en diferentes lotes respectivamente 0,0228 mmol/L de los siguientes agentes quelantes de ion metálico:

- i. Pioverdina (Pioverdinas, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).
- ii. Ferricromo (Ferrichrome Iron-free de Ustilago sphaerogena, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).
- 45 iii. Deferoxamina (sal de mesilato de deferoxamina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)
Deferoxamina (sal de mesilato de deferoxamina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).

iv. Deferasirox (Combi-Blocks, Inc., San Diego, EE. UU.).

v. DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético).

vi. EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

vii. BAPTA (ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacético).

5 Los diferentes reactivos fueron usados como se describe en el ejemplo 1 en una prueba automática de tiempo de protrombina (prueba PT) en un dispositivo de análisis Sysmex® CA-1500 (Sysmex Corp., Kobe, Japón). Como pruebas, se utilizaron los plasmas de control Ci-Trol 1 y Ci-Trol 2 descritos con más detalle en el ejemplo 1.

10 Para la determinación de la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos se almacenaron en estado líquido en botellas de vidrio selladas con un tapón a +37° C durante un período de 16-18 semanas. Aproximadamente cada un mes se extrajeron muestras de los reactivos y se determinó el tiempo de protrombina del mismo plasma de referencia.

15 Los diferentes resultados de medición (tiempo de protrombina en segundos, PT [s]) en el tiempo t_0 , después de dos y cuatro meses de almacenamiento (2 M, 4 M) y la correspondiente desviación en % de la medición de tiempo de protrombina en el tiempo t_0 se muestran en la Tabla 1 (plasma de control Ci Trol 1 como muestra) y en la Tabla 2 (plasma de control Ci-Trol 2 como muestra).

Tabla 1

Quelante	t_0 PT [s]	2 M PT [s]	4 M PT [s]	2 M %	4 M %
Pioverdina	12,0	11,8	13,4	-1,7	11,7
Ferricromo	12,1	11,9	12,9	-1,7	6,6
Deferoxamina	11,6	11,5	13,1	-0,9	12,9
Deferasirox	11,6	11,4	13,8	-1,7	19,0
DTPA	11,6	12,5	22,4	7,8	93,1
EDTA	11,8	35,9	71,5	204,2	505,9
BAPTA	11,6	40,2	72,8	246,6	527,6
Sin quelante	11,6	36,7	71,7	216,4	512,9

Tabla 2

Quelante	t_0 PT [s]	2 M PT [s]	4 M PT [s]	2 M %	4 M %
Pioverdina	43,5	37,6	38,7	-13,6	-11,0
Ferricromo	44,4	38,8	40,0	-12,6	-9,9
Deferoxamina	39,5	36,3	37,1	-8,1	-6,1
Deferasirox	38,9	32,8	43,5	-15,7	11,8
DTPA	39,0	39,1	82,0	0,3	110,3
EDTA	40,2	100,0	100,0	148,8	148,8
BAPTA	39,1	100,0	100,0	155,8	155,8
Sin quelante	38,8	100,0	100,0	157,7	157,7

20 Los tiempos de protrombina estables durante un período de cuatro meses (es decir, al menos 16 semanas) con desviaciones de menos del 20% en comparación con el valor inicial en el tiempo t_0 sólo se lograron con los reactivos de tiempo de protrombina estabilizados con quelantes de hierro conforme a la invención, es decir, con pioverdina,

ferricromo, deferoxamina o deferasirox. Tanto el reactivo almacenado líquido sin quelante como también los reactivos almacenados líquidos, a los cuales se les habían agregado los agentes quelantes de iones metálicos DTPA, EDTA o BAPTA conocidos del estado del arte (US 2017/0234895 A1), sólo proporcionaron como máximo después de 4 meses tiempos de protrombina notablemente divergentes.

5 Ejemplo 3: Determinación de la estabilidad de los reactivos líquidos de tiempo de protrombina estabilizados con diferentes quelantes de hierro en presencia de mayores concentraciones de iones Fe^{3+} .

10 En el tiempo t_0 , se añadió 0,00308 mM $FeCl_3$ (0,5 mg/L) a un reactivo de tiempo de protrombina líquido, que contenía proteína de factor tisular recombinante humana, fosfolípidos sintéticos e iones de calcio, y después se agregaron en diferentes lotes respectivamente 0,0228 mM de los agentes quelantes de iones metálicos mencionados en el ejemplo 2.

Los diferentes reactivos fueron usados como se describe en el ejemplo 1 en una prueba automática de tiempo de protrombina (prueba PT) en un dispositivo de análisis Sysmex® CA-1500 (Sysmex Corp., Kobe, Japón). Como pruebas, se utilizaron los plasmas de control Ci-Trol 1 y Ci-Trol 2 descritos con más detalle en el ejemplo 1.

15 Para la determinación de la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos en presencia de concentraciones elevadas de iones de Fe^{3+} , los reactivos fueron almacenados en estado líquido en botellas de vidrio selladas con un tapón a $+37^\circ C$ durante un período de 6 semanas. Semanalmente se tomaron muestras de los reactivos y se determinó el tiempo de protrombina del mismo plasma de referencia.

20 Los diferentes resultados de medición (tiempo de protrombina en segundos, PT [s]) en el tiempo t_0 , después de una, dos cuatro y seis semanas de almacenamiento (1 S, 2 S, 4 S, 6 S) y la correspondiente desviación en % de la medición de tiempo de protrombina en el tiempo t_0 se muestran en la Tabla 3 (plasma de control Ci Trol 1 como muestra) y en la Tabla 4 (plasma de control Ci-Trol 2 como muestra).

Tabla 3

Quelante	t_0 PT [s]	1 S PT [s]	2 S PT [s]	4 S PT [s]	6 S PT [s]	1 S %	2 S %	4 S %	6 S %
Pioverdina	12	11,2	11,4	11,5	11,4	-6,7	-5	-4,2	-5
Ferricromo	12,1	11,2	11,4	11,6	11,6	-7,4	-5,8	-4,1	-4,1
Deferoxamina	11,4	10,7	11	11,1	11,2	-6,1	-3,5	-2,6	-1,8
Deferasirox	11,6	10,9	10,9	11,1	11,4	-6	-6	-4,3	-1,7
DTPA	11,8	13	13,4	14,9	17,7	10,2	13,6	26,3	50
EDTA	11,6	13	15,9	30,2	49,6	12,1	37,1	160,3	327,6
BAPTA	11,6	13,2	17,7	38,3	60,8	13,8	52,6	230,2	424,1
Sin quelante	11,4	13,1	17,9	48,9	59,5	14,9	57	328,9	421,9

Tabla 4

Quelante	t_0 PT [s]	1 S PT [s]	2 S PT [s]	4 S PT [s]	6 S PT [s]	1 S %	2 S %	4 S %	6 S %
Pioverdina	44	39,6	40	40,1	35,5	-10	-9,1	-8,9	-19,3
Ferricromo	44,4	39,1	39,5	40,3	38,9	-11,9	-11	-9,2	-12,4
Deferoxamina	38	32,7	35,4	35,2	35,9	-13,9	-6,8	-7,4	-5,5
Deferasirox	39	35,1	33,5	31,2	32	-10	-14,1	-20,0	-17,9
DTPA	39,6	28,8	30,4	39,2	55,7	-27,3	-23,2	-1	40,7
EDTA	38,6	30,6	50	100	100	-20,7	29,5	159,1	159,1
BAPTA	38,6	32,7	61,8	100	100	-15,3	60,1	159,1	159,1

ES 2 773 009 T3

Sin quelante	38,4	32,1	64,8	100	100	-16,4	68,8	160,4	160,4
--------------	------	------	------	-----	-----	-------	------	-------	-------

5 Los tiempos de protrombina estables durante un período de seis semanas con desviaciones de menos del 20% en comparación con el valor inicial en el tiempo t_0 sólo se lograron en presencia de mayores concentraciones de iones de Fe^{3+} con los reactivos de tiempo de protrombina estabilizados con los quelantes de hierro conforme a la invención, es decir, con pioverdina, ferricromo deferoxamina o deferasirox. Tanto el reactivo almacenado líquido sin quelante como también los reactivos almacenados líquidos, a los cuales se les habían agregado los agentes quelantes de iones metálicos DTPA, EDTA o BAPTA conocidos del estado del arte (US 2017/0234895 A1), sólo proporcionaron como máximo después de 2 semanas tiempos de protrombina notablemente divergentes.

REIVINDICACIONES

1. Reactivo de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos, caracterizado porque el reactivo contiene además al menos un quelante de hierro, en donde al menos un quelante de hierro se selecciona del grupo de un sideróforo y de un 3,5-difenil-1,2,4-triazol.
- 5 2. Reactivo de tiempo de protrombina según la reivindicación 1, en donde el sideróforo se selecciona del grupo de la deferoxamina, pioverdina y el ferricromo.
3. Reactivo de tiempo de protrombina según la reivindicación 1, en donde el 3,5-difenil-1,2,4-triazol se selecciona del grupo de deferasirox, etil[3,5-bis (2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato y 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol.
- 10 4. Reactivo de tiempo de protrombina según una de las reivindicaciones precedentes, que contiene al menos un quelante de hierro en una concentración de 0,007 a 2,5 mmol/L, de manera particularmente preferida de 0,01 a 0,5 mmol/L.
5. Reactivo de tiempo de protrombina según una de las reivindicaciones precedentes, que además contiene iones Ca^{2+} .
- 15 6. Reactivo de tiempo de protrombina según la reivindicación 5, que contiene de 5 a 500 mmol/L de cloruro de calcio.
7. Reactivo de tiempo de protrombina según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína del factor tisular se selecciona del grupo de la proteína de factor tisular recombinante humana o animal y la proteína de factor tisular natural humana o animal a partir de un extracto de tejido.
- 20 8. Un proceso para la preparación de un reactivo líquido de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos y opcionalmente iones Ca^{2+} , caracterizado porque se proporciona un líquido que contiene proteína de factor tisular, fosfolípidos y al menos un quelante de hierro seleccionado del grupo sideróforo y 3,5-difenil-1,2,4-triazol y porque el líquido se vierte en un recipiente de reactivo sin que dicho líquido se liofilice.
- 25 9. Procedimiento para la estabilización de un reactivo de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos y opcionalmente iones Ca^{2+} , caracterizado porque al reactivo se adiciona al menos un quelante de hierro seleccionado del grupo sideróforo y 3,5-difenil-1,2,4-triazol.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en donde al menos un quelante de hierro se adiciona en una cantidad de modo que el reactivo contiene al menos un quelante de hierro en una concentración de 0,007 a 2,5 mmol/L, de manera particularmente preferida de 0,01 a 0,5 mmol/L.
- 30 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 y 9, en donde el sideróforo se selecciona del grupo de la deferoxamina, pioverdina y el ferricromo.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 y 9, en donde el 3,5-difenil-1,2,4-triazol se selecciona del grupo de deferasirox, etil[3,5-bis (2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato y 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-[1,2,4]triazol.
- 35 13. Uso de un reactivo de tiempo de protrombina según una de las reivindicaciones 1-7 en un procedimiento para la determinación de un parámetro de coagulación en una muestra de plasma.
14. Procedimiento para determinar un parámetro de coagulación en una muestra de plasma, caracterizado porque la muestra de plasma se mezcla con un reactivo de tiempo de protrombina según una de las reivindicaciones 1-7 para obtener una mezcla de reacción y se determina el parámetro de coagulación en la mezcla de reacción.
- 40 15. Procedimiento según la reivindicación 14 para la determinación de un parámetro de coagulación del grupo de tiempo de protrombina, fibrinógeno derivado y potencial de trombina endógena.
16. Procedimiento según la reivindicación 14 para la determinación del tiempo de protrombina, en donde se mide fotométricamente el cambio en la absorbancia de la mezcla de reacción y se determina el tiempo desde el momento de la mezcla del reactivo de tiempo de protrombina con la muestra de plasma hasta que se alcanza un valor umbral.
- 45 17. Uso de un quelante de hierro del grupo sideróforo y 3,5-difenil-1,2,4-triazol para la preparación de un reactivo de tiempo de protrombina que contiene proteína de factor tisular y fosfolípidos.

18. Uso según la reivindicación 17, en donde el sideróforo se selecciona del grupo de la deferoxamina, pioverdina y el ferricromo.

19. Uso según la reivindicación 17, en donde el 3,5-difenil-1,2,4-triazol se selecciona del grupo de deferasirox, etil [3,5-bis(2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il] acetato y 3,5-bis(2-hidroxifenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil) -1H- [1,2,4]triazol.

FIG 1

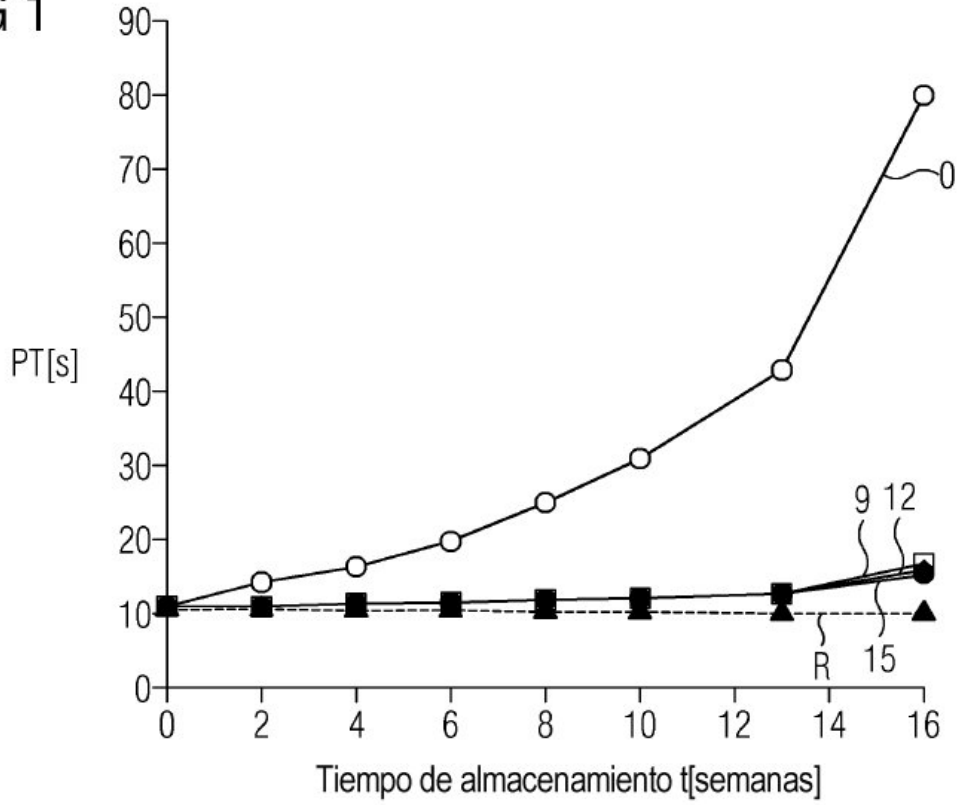


FIG 2

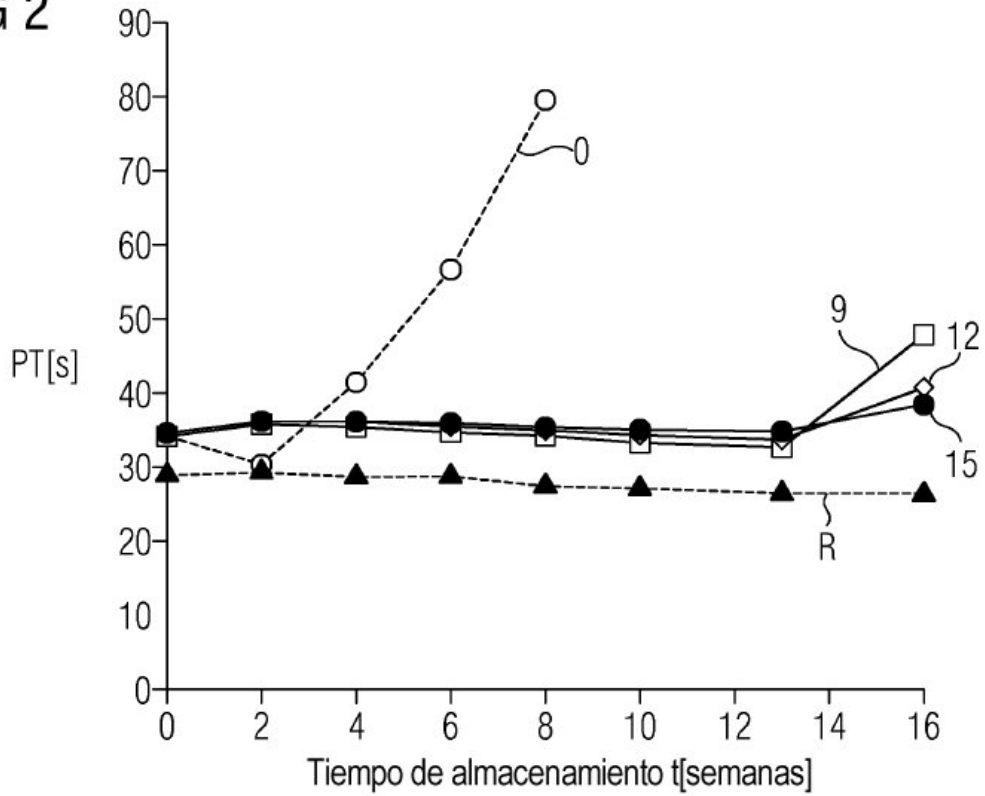


FIG 3

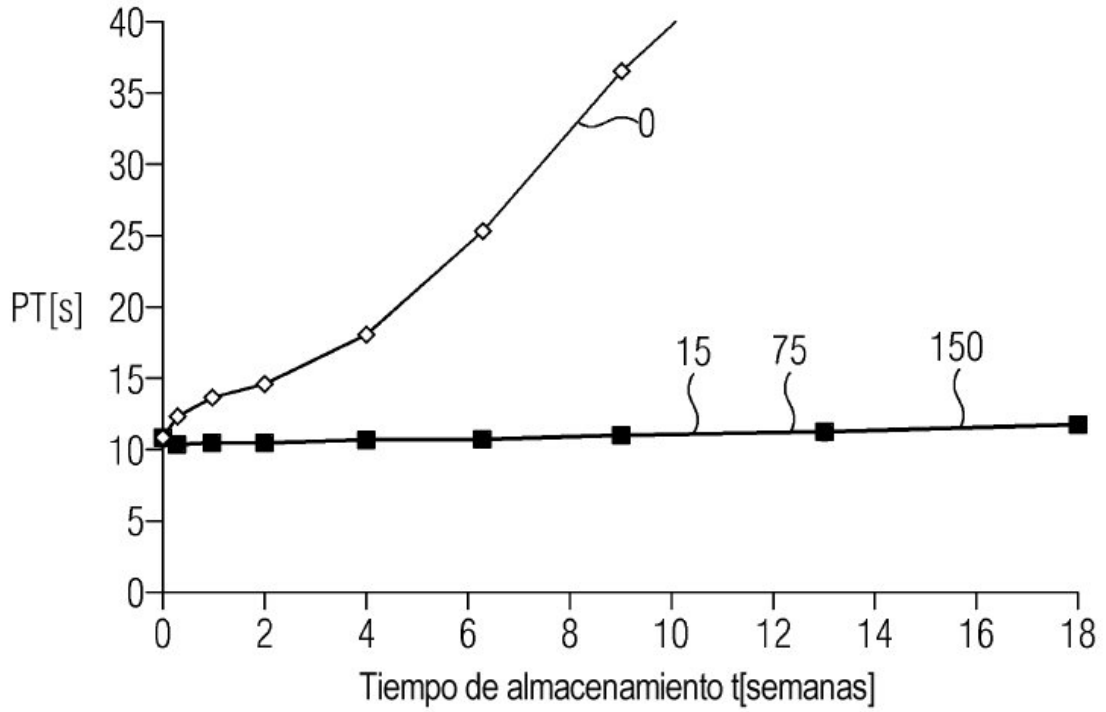


FIG 4

