



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0612967-6 A2**

(22) Data de Depósito: 26/04/2006
(43) Data da Publicação: 14/12/2010
(RPI 2084)



★ B R P I 0 6 1 2 9 6 7 A 2 ★

(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/86
C12Q 1/56

(54) Título: **MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE DE TROMBINA EM UMA AMOSTRA E KIT**

(30) Prioridade Unionista: 29/04/2005 EP 05290952.0

(73) Titular(es): Synapse B.V.

(72) Inventor(es): Hendrik Coenraad Hemker, Peter Giesen, Raed Al- Dieri, Robert Wagenvoort, Sabastiaan Nijhuis, Suzette Beguin

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006004945 de 26/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/117246 de 09/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO IN WTRO DA ATIVIDADE DE TROMBINA EM UMA AMOSTRA E KIT A presente invenção refere-se a um método para a determinação in vitro da atividade da trombina em uma amostra, em que a amostra é uma amostra sanguínea e a geração da trombina é medida pelas etapas de: colocar uma camada de dita amostra em contato com um substrato fluorogênico da trombina, em que dita camada possui uma espessura dentro de um intervalo de 0,05 a 5 mm e uma superfície dentro de um intervalo de 10 a 500 mm²; permitir a geração de trombina em dita amostra; medir a fluorescência emitida a partir da superfície da camada, pelo grupo fluorescente liberado a partir do substrato fluorogênico como um resultado da ação enzimática da trombina gerada em dito substrato fluorogênico.

“MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE TROMBINA EM UMA AMOSTRA E KIT”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método de determinação, em especial, da medida do tempo de curso da atividade da trombina *in vitro*, isto é, da medida da trombina ativa em uma amostra, em especial, conforme ela se desenvolve em uma amostra de coagulação que consiste em sangue total. O resultado da medida da atividade da trombina pode ser denominado “curva de atividade da trombina”, ilustrada na Figura 1.

A presente invenção também se refere a meios que permitem a medida da trombina ativa seguindo esta geração em uma amostra *in vitro*. Ela também é direcionada ao uso de dito método de medida para a detecção ou a monitoramento da condição de um paciente, incluindo para a detecção ou o monitoramento de uma condição patológica relacionada à deficiência na coagulação sangüínea.

A presente invenção também se refere ao uso do método de medida para a seleção de substâncias, incluindo a seleção de drogas que poderiam interagir no processo de coagulação, em especial, com a atividade da trombina.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As doenças trombóticas, tais como o infarto coronário, derrame, embolismo pulmonar e diversos outros são responsáveis por cerca de metade de todas as mortes e deficiências na sociedade ocidental. Nos países em desenvolvimento, elas aumentam com o grau de desenvolvimento. As doenças hemorrágicas, embora numericamente menos importantes, também são uma causa significativa das mortes. Desta forma, a sobre- e a subfunção do sistema homeostático é um mecanismo patogênético extremamente importante. Portanto, ele é mais surpreendente do que um bom teste de função clínica e não está disponível.

PAPEL DA TROMBINA NAS DOENÇAS HOMEOSTÁTICAS E TROMBÓTICAS

Na homeostase e na trombose, a trombina desempenha um papel essencial. Na doença trombótica venosa, isto têm sido reconhecido (1) há muito tempo e é, de maneira convincente, demonstrado pelo fato da prevenção e do tratamento da trombose venosa ser melhor ocasionada pela diminuição da
5 atividade da trombose, pela inibição direta (hirudina, melagastan) ou pela menor síntese (antagonistas da vitamina K) ou pelo decaimento aumentado (heparinas). No último decênio, tornou-se muito claro que a trombina é tão importante na doença arterial quanto na doença venosa. Os testes clínicos mostraram que os
10 antagonistas da vitamina K (2) bem como da heparina (3) diminuem a taxa de nova ocorrência do enfarto do miocárdio. Uma papel da trombina na hemorragia é sugerido pelo tempo de hemorragia prolongado observado quando a geração de trombina é tão profundamente afetada quanto nas superdosagens graves de anticoagulantes orais (4) ou de heparina (5). Da mesma maneira, as hemofalias
15 são doenças do sistema formador de trombina (6).

TODOS OS ELEMENTOS DO SANGUE PARTICIPAM NA FORMAÇÃO DA TROMBINA

Pesquisas modernas levaram ao reconhecimento de que a trombina é formada através da cooperação dos elementos formados do sangue e do plasma. As células sangüíneas vermelhas (RBCs) são as menos ativas
20 neste aspecto, embora em uma pequena porcentagem delas, a membrana externa exiba atividade procoagulante (7). Muito mais importante é que as células sangüíneas brancas carregam o fator de atividade do tecido. Esta atividade é normalmente codificada, mas na lesão, ela se manifesta através de interações com as plaquetas sangüíneas (8, 9). Os principais participantes são
25 indubitavelmente as plaquetas e o sistema de coagulação plasmático. Nos compêndios, ainda é encontrado que as plaquetas são responsáveis pela homeostase primária e a trombose arterial, enquanto que a coagulação do plasma serve para a consolidação da obstrução homeostática e é o mecanismo

atrás da trombose venosa. Este enfoque é devido ao fato de que o plasma e as plaquetas foram estudados separadamente de cada um. Na realidade, a cooperação entre as plaquetas e o plasma e as outras células do sangue é essencial em ambas a homeostase primária e secundária e na trombose arterial e venosa. A formação da obstrução das plaquetas desempenha um papel na geração da trombina porque os interstícios em um agregado de plaquetas forma um nicho não agitado em que a trombina pode se formar sem ser arrastada pelo fluxo sangüíneo. Isto é o porquê a medida da geração de trombina no sangue total de coagulação está tão próximo à realidade fisiológica.

Aparte da formação de uma “esponja” em que a trombina pode se formar, as plaquetas também contribuem ativamente para a geração da trombina. Elas liberam o fator V e apresentam a superfície de fosfolípido pró-coagulante requerida para a conversão de pró-trombina, vem como para as diferentes etapas no mecanismo de coagulação que levam à formação de protrombinase (10). A velocidade de geração da trombina e a quantidade formada desta maneira, depende da atividade da plaqueta, bem como das proteínas do plasma envolvidas. Particularmente interessante é o papel da fibrina de polimerização. O fator de Von Willebrand (vWf) interage com a fibrina de polimerização e sofre uma mudança conformacional que o torna reativo para o receptor de plaqueta GPIb e através deste ligante, coopera com a plaqueta, se tornando um pró-coagulante (11, 12). Isto mostra que a formação de um coágulo de fibrina não é o encerramento da homeostase e que a formação da trombina em uma obstrução (ou trombo, ou coágulo) é o evento chave no processo. De fato, como será visto abaixo, menos de 95% de toda a trombina formada é formada após a coagulação ter ocorrido e esta trombina é essencial na homeostase e no processo de trombose (H&T). Talvez, a melhor prova das fortes ligações entre as plaquetas e o sistema de coagulação

plasmático é o fato de que todos os “inibidores da agregação” e outros agentes anti-plaquetas também inibem a geração da trombina em plasma rico em plaqueta (ou sangue total). Isto foi mostrado para a aspirina (13), abciximab (14), MK383 (15) e o clopidogrel (16). Inversamente, o fato de que a excelência
 5 do par de drogas anti-paquetas, aspirina, previne a trombose venosa (17) e ilustra adicionalmente a conexão próxima entre a função da plaqueta e a coagulação sangüínea.

Desta maneira, em resumo, a quantidade de trombina formada em um coágulo é uma característica essencial no processo de homeostase e
 10 trombose e todos os elementos do sangue fazem parte de sua formação.

Um maior TG indica invariavelmente o risco trombótico, se ele é devido à deficiência da antitrombina ou um excesso de protombina. Da mesma maneira, as doenças na via da proteína C (deficiência de proteína S e C, fator V_{Leiden}) da geração da trombina é maior do que o normal. Isto controla a
 15 coagulação do plasma como tal, mas se torna especialmente óbvio se a via da proteína C for ativada pela trombomodulina (Figura 1). A tendência trombótica induzida pelos contraceptivos orais pode ser atribuída a uma resistência adquirida à proteína C ativada que causa um aumento de 10% da geração de trombina que se torna mais óbvia quando é adicionado o TM ou o APC (18, 19).

20 Um caso particularmente interessante é o lúpus anticoagulante. Este tipo de anticorpo induz um aumento do tempo de latência (*lag*) da formação da trombina e, portanto, um aumento do tempo de coagulação, mas também uma importante resistência à atividade do sistema da proteína C (20). Isto explica o “paradoxo LE”, isto é, um efeito anticoagulante que é
 25 acompanhado por uma tendência trombótica.

Foi descoberto que as quantidades em excesso dos fatores II, VIII e VII se correlacionam com a ocorrência do infarto do miocárdio (21-24). Da mesma maneira, os níveis maiores do que o normal de vWf que aumentam a

geração de trombina (12) é um fator de risco para a trombose arterial (25, 26).

Em uma sub população de pacientes jovens com derrame (cerca de 30%), ambos a geração de trombina na Plaqueta Rica em Plasma (PRP) e o vWf foram demonstrados como sendo significativamente maiores do que o normal (27). Em todas as deficiências do fator de coagulação congênitas, a
5 geração de trombina é diminuída. Isto foi demonstrado para as hemofilias A, B e C (deficiência do fator VIII, IX ou XI; 28-31) bem como para todas as deficiências raras (protrombina, fatores V, VII, X, XII; 32). Uma tendência à hemorragia é observada logo que o TG está abaixo de 20% do normal. Na
10 hemofilia A, não apenas a infusão do fator VIII ou a administração do DDAVP aumenta a capacidade do sangue de formar a trombina, mas também a terapia de superação do inibidor com produtos que contêm protrombina e/ou o fator VII aumenta a geração de trombina.

A trombopenia severa (menor de $50.000 \mu\text{l}^{-1}$) causa uma
15 diminuição da geração de trombina bem como as trombopatias Glanzman e Bernard-Soulier. Na doença de von Willebrand, – até o momento conhecida por induzir uma disfunção na adesão da plaqueta em altos níveis de cisalhamento – a geração da trombina no plasma rico em plaqueta é significativamente prejudicado (vide acima). O defeito no PRP é muito maior do que na Plaqueta
20 Pobre em Plasma (PPP), o que indica que ele não pode ser explicado pela diminuição concomitante – geralmente suave – do fator VIII.

O TROMBOGRAMA

As seguintes características devem ser levadas em consideração com relação ao mecanismo da geração da trombina quando localizado o
25 problema a ser resolvido de acordo com a presente invenção.

Mesmo um esquema simplificado do mecanismo da formação da trombina (Figura 1) mostra que ela é extremamente complexa e repleta de reações de feedback positivo e negativo. Realmente, tão complexo de modo a

se tornar um sistema não linear, isto é, não há relações simples entre a concentração dos reagentes, e as consequências e o fenômeno do limiar podem fazer com que o sistema reaja essencialmente de forma não prevista. A reação do todo para uma dada ativação pode, portanto, não ser deduzida a partir dos conhecimentos das concentrações individuais dos reagentes relevantes (que podem até não ser conhecidos) e apenas um teste que mede a função do sistema completo conforme contido no sangue de um paciente revela o estado homeostático/ trombótico daquele paciente.

O resultado de todo o processo da geração de trombina é o aparecimento e o desaparecimento de uma atividade de trombina transiente. A curva de atividade da trombina contra o tempo ou ThrombogramTM (TG) é caracterizada por uma fase de iniciação, ou fase lag, durante a qual apenas minúsculas quantidades de trombina são formadas; segue então um surto de atividade, conhecido fase de propagação (Figura 1). O sangue forma um coágulo no primeiro instante do surto e quase toda a trombina é formada após o coágulo ter sido formado. Toda a trombina formada é subsequente inativada pela anti-trombose do sangue. Estas proteínas se ligam estequiometricamente à trombina em uma reação lenta. A velocidade de inativação é proporcional à concentração da trombina e da antitrombina. Contudo que a taxa de conversão da protrombina seja maior do que a taxa de inativação da trombina, o nível de trombina aumenta. Conforme o nível de trombina aumenta, a taxa de inativação também aumenta. No pico, ambas as velocidades são iguais, a partir de então predomina o decaimento. A curva obtida da atividade de trombina mostra as diversas fases e, em especial, mostra o pico da geração de trombina, o tempo para atingir o pico e o potencial de trombina endógena (ETP).

ESTADO DA TÉCNICA

A necessidade de medida da função da homeostase e do sistema de trombose não escapou à atenção da profissão médica ao longo do último

século. As soluções para este problema não mudou essencialmente até a década de 1990, oferecendo meios que eram práticos mas inadequados ou adequados mas não práticos.

As soluções práticas se referem à medida do tempo de coagulação e o tempo de hemorragia. O tempo de hemorragia mede o comprimento da fase de iniciação da geração de trombina e, portanto, reflete apenas parte da função (33, vide também acima). O único fato que muitas variedades do teste estão em uso no laboratório clínico, cada um útil apenas em uma situação específica, apenas mostra que um tempo de coagulação não reflete o mecanismo de coagulação como um todo. Para o tempo de hemorragia, pode ser dito que ele é extremamente impreciso, possuindo um coeficiente de variação de cerca de 40%, que limita fortemente seu uso prático (34).

Desde a década de 1950, foi reconhecido que a medida do tempo de curso da trombina no sangue de coagulação é a melhor para estimar a função H&T (35-37). Até 1992, o único modo de medir o TG foi ao tirar as amostras do sangue de coagulação ou do plasma e determinar o teor de trombina no mesmo. Isto leva uma hora homem por curva e, portanto, pode ser apropriado para os propósitos de pesquisa, mas não para o uso epidemiológico ou clínico moderno.

Em 1990, Hemker e Béguin et al. (EP-B1 0.420.332) lançaram a idéia de adicionar ao sangue de coagulação um substrato cromogênico (produção de cor) que possui alta especificidade pela trombina, mas uma baixa taxa de movimentação (K_{cat} baixo) e pouca afinidade de ligação pela trombina (alto K_m). Tal substrato permanece presente durante todo o processo de TG e a soma (isto é, o número inteiro) da atividade de trombina sobre o tempo pode ser medida a partir da quantidade total de produto formado. Idealmente, isto mede o Potencial de Trombina Endógena (ETP), isto é, a Área Sob a geração de trombina (AUC).

Posteriormente, Hemker et al., desenvolveu ainda este método para obter o todo da curva de TG (38). Isto foi baseado na princípio de que, se as constantes cinéticas dos substratos forem favoráveis, a velocidade da reação pode, em uma boa aproximação, permanecer proporcional à concentração de trombina durante o todo do processo de coagulação, tal que o primeiro derivado da concentração do produto fornece um curva que é proporcional à atividade da trombina. Este método, descrito no documento WO 03/093831A1, era uma extensão e elaboração do procedimento descrito previamente no documento EP-B2 0.420.332, onde apenas o nível final do produto é medido, de cuja maneira a área sob a curva do TG, isto é, o ETP é obtido.

O substrato utilizado neste método gera um produto amarelo, a monitoração do qual requer a medida da densidade óptica e, portanto, um meio de reação opticamente transparente. A turbidez causada pela coagulação do fibrinogênio deve, portanto, ser evitada e o fibrinogênio deve ser removido ou sua polimerização deve ser evitada pela adição de inibidores da polimerização. Entretanto, a remoção do fibrinogênio possui a desvantagem de remover um importante reagente e não pode ser realizado sem a remoção dos elementos celulares, tal como as importantes plaquetas sanguíneas. Além disso, a adição dos inibidores da polimerização, nas altas concentrações requeridas para prevenir completamente a formação de fibrina, inibe a enzima de conversão de protrombina e as reações bioquímicas que levam a sua formação.

Em contraste com a densidade óptica, a fluorescência pode ser medida em meios túrbidos. Ao contrário dos substratos cromogênicos, os substratos que geram um produto fluorescente (substratos fluorogênicos) podem, portanto, ser utilizados no plasma que não é defibrinado e, portanto, também em Plasma Rico em Plaqueta (PRP) (33, 39-43). O uso de um substrato fluorogênico introduz duas importantes desvantagens, entretanto: (1) a intensidade de fluorescência não é proporcional à concentração do fluoróforo

por causa do denominado efeito do filtro interno; (2) com os substratos disponíveis, a taxa de formação do produto não é necessariamente proporcional à concentração de enzima. A última desvantagem pode ser superada ao utilizar os substratos que não são significativamente consumidos, como no método cromogênico. Tais substratos não estão disponíveis no momento. Na prática atual deste momento, ambos os problemas são solucionados juntos pela comparação contínua do sinal experimental a aquele de uma atividade do tipo trombina constante agindo sob condições exatamente idênticas que aquelas na amostra medida (documento WO 03/093831 A1).

O método cromogênico obviamente não pode ser utilizado com o sangue total porque o sangue não é transparente. Foi relatado que os substratos fluorogênicos são aplicáveis para medir TG no sangue total (44). Na prática atual, este método publicado, gera sinais instáveis mais freqüentes que nunca e não se assemelha ao curso da geração de trombina como ele é conhecido a partir do método de subamostragem estabelecido (Figura 2). Do mesmo modo, a relação quantitativa entre o sinal obtido e a quantidade de trombina presente varia de experimento para experimento. Em resumo, o método descrito não gera resultados reprodutíveis e quantificáveis.

Outra possibilidade é a forte diluição do sangue (10 vezes ou mais), tal que as células sangüíneas vermelhas RBC possuem menos influência (45). Isto gera curvas que são, de fato, melhores do que aquelas que são obtidas do sangue minimamente diluído. Esta abordagem não pode, entretanto, ser considerada como representante da situação fisiológica por duas razões. Em primeiro lugar, após a formação de um coágulo (isto é, durante a fase mais importante da geração da trombina), as reações de formação de trombina são de difusão limitada porque elas ocorrem em interfaces insolúveis (superfície de plaquetas e outras células imobilizadas na rede de fibrina). Isto as torna mais sensíveis à diluição do que as reações em

solução livre, tal como as reações de inativação de trombina. No sangue diluído, o equilíbrio entre a formação de trombina e as reações de inativação de trombina, portanto, não é representativo para a situação existente *in vivo*. Isto é ainda mais importante no caso em que os inibidores patológicos estão contidos no sangue (por exemplo, na hemofilia de terapia refrativa ou no inibidor de lúpus eritematosos). É bem conhecido na prática clínica que os inibidores da coagulação perdem ser efeito na diluição *in vitro*.

Portanto, o problema permanece em como obter um sinal a partir do qual a concentração de proteína mutável pode ser determinada em uma amostra de sangue de coagulação que é menos do que dez vezes diluído. A presente invenção pretende fornecer uma solução para este problema que supera pelo menos algumas das desvantagens encaradas no estado da técnica anterior.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Foi revelado pelos inventores que os resultados irreprodutíveis e erráticos obtidos antes da presente invenção foram pelo menos devido a duas causas; (a) sedimentação antes dos coágulos de sangue e (b) retração do coágulo após a coagulação ter ocorrido (vide Figura 4). Segue depois disto que o volume do qual a fluorescência é obtida muda durante a reação e que a forma geométrica da superfície muda, causando a concentração errática e a reflexão da luz que perturba o sinal recuperado. Inesperadamente, foi descoberto pelos Depositantes que estes fenômenos não ocorrem quando se trabalha com uma camada fina de sangue e, em especial com uma camada fina que possui uma rede e/ou microgrânulos. A forma geométrica de uma camada fina, junta ou não com dita rede e/ou grânulos, previne de fato a sedimentação e a retração. Entretanto, o volume da reação permanece desconhecido, portanto ele deve ser determinado durante a medida. Isto é feito pela adição, no início da experiência, de uma concentração conhecida de uma molécula fluorescente. O sinal é pequeno e, portanto, a razão do sinal para o

ruído é vantajosamente aumentada pela medida sobre uma ampla área de superfície com qualquer dispositivo apropriado conhecido no estado da técnica. Além disso, uma grande razão do volume para a superfície tende à evaporação, e vantajosamente devem ser tomadas medidas apropriadas para
5 prevenir a mesma.

De acordo com a presente invenção, um método é descrito que é um método para a determinação *in vitro* do curso de atividade da trombina pelo tempo em uma amostra, em que a amostra é uma amostra de sangue e a geração da trombina é medida pelas etapas de:

- 10 - colocar uma camada de dita amostra em contato com um substrato fluorogênico da trombina em que dita camada possui uma espessura dentro de um intervalo de 0,05 a 5 mm e uma superfície dentro de um intervalo de 10 a 500 mm²;
- permitir a geração de trombina em dita amostra;
- 15 - medir a fluorescência emitida a partir da superfície da camada, pelo grupo fluorescente liberado a partir do substrato fluorogênico como um resultado da ação enzimática da trombina gerada em dito substrato fluorogênico.

O método de determinação da atividade de trombina permite a
20 medida do tempo de curso da concentração de trombina conforme ela resulta de sua formação e subsequente inativação, de acordo com o esquema de coagulação.

O método da presente invenção pode ser realizado em amostra sanguínea, tal como amostras de sangue total ou amostras de Plasma Rico em
25 Plaqueta (PRP).

A trombina é deixada para ser gerada na amostra geralmente após o contato de dita amostra com componentes apropriados para o início de geração de trombina. Tais componentes podem compreender fatores de

coagulação, tais como o fator do tecido e, possivelmente, íons cálcio.

Enquanto a trombina é gerada e está presente na mistura da reação (trombina ativa), ela reage com seu substrato fluorogênico, resultando na liberação do grupo fluorescente do substrato.

5 A reação é planejada de tal modo que o substrato fluorogênico está presente durante toda a duração da reação, em quantidades altas o suficiente para permitir a medida da atividade de trombina. Por exemplo, a concentração do substrato é de cerca de ou acima do K_m do substrato para trombina, tal que o consumo do substrato não possui muita influencia na
10 velocidade da reação. O substrato é convertido pela trombina, levando a um aumento da fluorescência emitida a partir da superfície da amostra analisada.

 O método definido na presente invenção permite que a geração da trombina ocorra em uma amostra de sangue, em especial, em uma amostra de sangue total, de tal modo que é essencialmente comparável à geração de
15 trombina que ocorre no corpo. Portanto, ela fornece um método confiável de medida para aplicação nos estudos de homeostase e trombóticos.

 A etapa de medida do aumento da fluorescência emitida a partir da superfície da camada da amostra analisada, como resultado da liberação do grupo fluorescente a partir do substrato através da ação da trombina, é
20 realizada especialmente utilizando um dispositivo ótico que permite tanto a iluminação de amplas superfícies, tais como as superfícies que possuem de 10 a 500 mm² e que permitem coletar a luz emitida a partir da superfície. O comprimento de onda selecionada para a medida da fluorescência é determinado pelo grupo fluorescente selecionado. Um comprimento de onda é
25 determinado para a excitação da luz que é fornecida à amostra para proceder com a medida. Outro comprimento de luz é determinado para a luz emitida resultando na liberação do grupo fluorescente do substrato fluorogênico da trombina. Um dispositivo óptico, tal como um leitor de prato fluorescente

conhecido pelos técnicos no assunto (por exemplo, o leitor de prato fluorescente Ascent, Thermolabsystems) é apropriado para a medida da fluorescência.

De acordo com uma realização da presente invenção, a amostra
5 a ser analisada, em especial a amostra de sangue total, é preenchida em um ou mais recipientes permitindo vantajosamente a realização da análise de diversas amostras ao mesmo tempo. Tais recipientes são projetados para permitir que a amostra preencha, de acordo com as condições definidas de espessura e superfície da camada de amostra a ser analisada. Por exemplo,
10 micropratos de fundo chato contendo cavidades ou um recipiente ou suporte que possui outra forma geométrica apropriada, conhecida pelo técnico no assunto de tal análise podem ser utilizados.

Outros dispositivos podem ser utilizados como suporte para as amostras se eles preencherem os requisitos de permitir que ditas amostras
15 sejam fornecidas para a análise como uma camada de acordo com as definições da presente invenção. Portanto, a descrição do método e dos meios para realizar a presente invenção, que é feita com referência às cavidades (dos micropratos) contendo as amostras pode ser aplicada a outros dispositivos (recipiente ou suporte) contendo as amostras.

20 De acordo com o método da presente invenção, a concentração de trombina durante a análise é uma função da medida da fluorescência do grupo fluorescente liberado do substrato de trombina fluorogênico. Ele é especialmente proporcional a taxa de aumento do aparecimento da fluorescência.

25 Consequentemente, o método da presente invenção permite a medida da concentração de trombina durante todo o tempo da atividade da trombina da amostra, contanto que o substrato fluorogênico esteja presente em quantidades apropriadas.

Portanto, o curso da atividade de trombina, antes e após a coagulação de sangue, até o pico da trombina e também durante a diminuição da concentração de trombina após o pico de trombina que foi obtida como um resultado da inativação da trombina, é representada pela medida da curva de concentração de trombina dependente do tempo. Durante diversas etapas da atividade da trombina, o substrato fluorogênico reage com a trombina que está presente e é especialmente hidrolisado, resultando na liberação do grupo fluorescente.

Uma vantagem particular da presente invenção é que o método permite a medida da geração de trombina em uma amostra, em especial em uma amostra de sangue total que não é diluído ou que é minimamente diluído, dentro de um intervalo de no máximo 10 vezes, em especial, menor ou igual que 4 vezes.

Em uma realização particular do método descrito, a espessura da camada da amostra a ser analisada, em especial do sangue total é de 1 a 3 mm, de preferência, de cerca de 2 mm ou menos.

Em uma realização particular do método, a superfície da amostra, especialmente da amostra de sangue total, quando é preenchida nas cavidades dos micropratos ou qualquer recipiente ou suporte apropriado é maior que 20 mm², por exemplo, de 30 mm² a 200 mm², de preferência, maior do que 100 mm², em particular dentro de um intervalo de 150 a 200 mm².

Como um exemplo a amostra é preenchida em cavidades de micropratos, cada cavidade possuindo um diâmetro de 15 mm e a espessura da amostra de sangue é inferior a 2 mm, permitindo a medida em uma superfície de cerca de 175 mm².

A medida da atividade de trombina é realizada de uma maneira que permita múltiplos pontos de leitura da fluorescência na superfície de cada amostra.

De acordo com uma realização da presente invenção, o método é realizado com uma amostra, em especial uma amostra de sangue total que é preenchida nas cavidades de um prato ou outro recipiente ou suporte, em que

ditas cavidades também contêm uma rede, especialmente com um tamanho de malha de 50 μm .

Alternativamente ou em adição a tal rede em uma realização da presente invenção, a amostra, em especial a amostra de sangue total, é
5 preenchida dentro de uma cavidade ou um prato ou outro recipiente ou suporte que contém microgrânulos.

A presença de dita rede e/ou microgrânulos é vantajosa para auxiliar na dispersão do sangue na cavidade e, especialmente, para prevenir a retração do coagulo no sangue de coagulação. Em outras palavras, a presença
10 da rede ou dos microgrânulos pode prevenir os distúrbios da superfície do sangue de coagulação que perturbam o sinal que é medido durante a atividade da trombina. Tal rede e/ou microgrânulos pode melhorar a atenuação dos efeitos da retração que são obtidos utilizando uma ampla superfície para a medida. Outros meios que permitem tal efeito também podem ser utilizados.

15 Em uma realização particular da presente invenção, as cavidades contendo a amostra, em especial as amostras de sangue total são cobertas para evitar a secagem do sangue durante o tempo de medida da atividade da trombina, como um resultado da evaporação. Tal cobertura pode ser realizada com materiais usuais, tais como tipos de filme plástico fino, contanto que eles
20 não interfiram na medida da fluorescência.

A medida da atividade de trombina na amostra sangüínea é realizada a partir do tempo onde a amostra é preenchida dentro de cavidades (ou qualquer outro dispositivo apropriado tal como uma fenda) e os componentes requeridos para iniciar a geração de trombina são fornecidos a
25 dita amostra, incluindo o fator do tecido, até o tempo onde a trombina foi consumida no processo de coagulação.

Em uma realização particular do método da presente invenção, a quantidade de substrato fluorogênico de trombina adicionado à amostra está

dentro de um intervalo de 50 a 1.000 μM . De acordo com o método descrito, a fim de ser capaz de conhecer a concentração de trombina ativa em termos absolutos (isto é, em nM/L), é necessário conhecer o volume da amostra de sangue dentro da qual a medida da fluorescência é realizada. Para esta finalidade, uma concentração conhecida de um fluoróforo pode ser adicionada ao substrato fluorogênico da trombina, em que as proporções respectivas do substrato de trombina para o fluoróforo estão no intervalo de 1% a 10% da quantidade de molécula fluorescente ligada ao substrato de trombina, em especial, no intervalo de 1% a 5%.

Em uma realização particular da presente invenção, o fluoróforo é da mesma natureza que a molécula fluorescente que é liberada pela ação da trombina sob o substrato fluorogênico.

Em outra realização, este fluoróforo é uma espécie diferente do que a molécula fluorescente do substrato fluorogênico. Neste caso, a medida da fluorescência leva em consideração a presença desta nova espécie de fluoróforo; isto inclui especialmente a medida da fluorescência do fluoróforo.

A adição de uma concentração conhecida de tal fluoróforo fornece um padrão interno na amostra a ser analisada e permite a avaliação do volume de amostra em que a fluorescência é realmente medida.

A fim de realizar o método de determinação da geração da trombina em uma amostra, em especial em uma amostra de sangue total, um substrato sintético para a trombina que consiste em um acoplamento químico orgânico com a molécula fluorescente é vantajosamente utilizado.

O substrato fluorogênico sintético pode ser um oligopeptídeo que possui a seqüência de 2 a 30 resíduos de aminoácidos acoplados com uma molécula fluorescente.

Pode ser especialmente útil que o grupo fluorogênico esteja ligado ao um terminal de resíduo de lisina ou arginina no substrato por causa

das divisões da trombina, de preferência, grupos ligados a estes resíduos de aminoácidos.

De acordo com uma realização particular, a molécula fluorescente utilizada é a AMC (7-amino-4 metilcumarina) ou o *p*-nitroanilida. Os substratos
5 sintéticos foram descritos por Rijkers, D. T., H. C. Hemker, et al., (1996), Int J Pept Protein Res 48 (2): 182-93; Rijkers, D. T., S. J. Wielders, et al., (1995), Thromb Res 79 (5-6): 491-9; Wielders, S. M. Mukherjee, et al., (1997), Thromb Haemost 77(4): 629-36.

Um substrato de trombina fluorogênica sintética particular
10 apropriada para realizar a presente invenção é a Z-Gly-Gly-Arg-AMC (disponível pela BACHEM).

Em uma realização particular da presente invenção, as cavidades (ou qualquer outro dispositivo apropriado) contendo a amostra pode ainda compreender um gel, possivelmente um gel contendo íons cálcio, dito gel
15 sendo preparado tal que ele não permite a diluição do sangue total da amostra. O gel, tal como o Sefadex ou os géis de agarose podem ser utilizados na medida em que eles não são secos, de tal modo que eles permitiriam que o líquido do plasma penetre no gel.

Quando um gel é utilizado, ele pode ser preenchido nas
20 cavidades antes ou junto com a amostra de sangue total.

Os compostos que podem ser adicionados à amostra, a fim de permitir a geração da trombina, compreendem o fator do tecido e os íons cálcio, cujos compostos são adicionados em quantidades que permitem que a coagulação inicie.

25 Tais quantidades podem estar dentro do intervalo de 0,05 picomol/L a 15 nanomol/L para o fator do tecido, e cerca de 10 mM de íons Ca^{++} quando é utilizado sangue citrado. A presente invenção também cobre explicitamente o caso em que o sangue nativo, não anticoagulado é utilizado,

em cujo caso não precisa ser adicionado nenhum Ca^{++} . Alternativamente, em certas aplicações é mais vantajoso economicamente, não adicionar o fator do tecido a fim de investigar a capacidade de coagulação espontânea do sangue. O fator do tecido, quando necessário, é adicionado pouco antes de iniciar a
5 medida.

Os íons cálcio e/ou o substrato fluorogênico pode ser adicionado tanto diretamente com a amostra de sangue, em especial quando o substrato de fluorogênico e o cálcio são utilizados em uma solução. O fator do tecido também pode ser adicionado alternativamente à amostra de sangue.

10 Quando a amostra e os diversos compostos são preenchidos nas cavidades, a medida é imediatamente realizada.

Em uma realização particular do método da presente invenção, o sangue total que é analisado é o sangue citrado.

O método de medida da atividade de trombina na amostra de
15 sangue total pode ser vantajosamente utilizado para a detecção ou monitoramento de uma doença homeostática ou uma doença trombótica ou para a detecção ou monitoramento da possibilidade que tal doença aparenta em um paciente.

O método também permite a detecção ou o monitoramento da
20 interação de determinada(s) substância(s) na atividade de trombina em uma amostra de sangue total, em que dita(s) substância(s) determinada(s) é(são) adicionadas à amostra a ser analisada ou é (são) adicionadas durante a geração da trombina.

As substâncias a serem testadas, de acordo com o método são,
25 por exemplo, substâncias farmacêuticas ou outros compostos que possuem um efeito de coagulação no sangue, tal como os fatores de coagulação ou drogas ou fatores anticoagulantes ou drogas. Os inibidores de trombina podem, em especial, ser testados de acordo com o método da presente invenção.

Em outro aspecto, o método da presente invenção pode ser utilizado para selecionar substâncias a fim de determinar sua capacidade de interação com a atividade da trombina.

De acordo com a presente invenção, o método que foi descrito
5 acima e que será ilustrado nos exemplos, pode ser utilizado especialmente para a medida do Potencial de Trombina Endógena (ETP) da amostra de sangue total.

Ele também pode ser utilizado para a medida do tempo do pico para a trombina ou para a medida do tempo de coagulação.

10 Ele também é útil para a medida do nível do pico de trombina gerada durante o teste.

O método da presente invenção permite, de fato, a medida da denominada curva da trombina que é o primeiro derivado da medida da fluorescência que resulta da reação entre a trombina e o substrato
15 fluorogênico.

Em um método particular da presente invenção, uma etapa de calibração é realizada tal como a calibração descrita no documento WO 03/093831.

O método da presente invenção foi descrito em relação à amostra
20 biológica que é a amostra de sangue total. Isso também poderia ser utilizado para avaliar uma amostra que seria o Plasma Rico em Plaqueta (PRP) ou mesmo o Plasma Pobre em Plaqueta (PPP).

A presente invenção também se refere a um kit para a realização do método descrito acima e nos exemplos que seguem, em que dito ki
25 compreende:

- um substrato fluorogênico para a trombina,
- o fator do tecido e os íons cálcio para permitir a geração da trombina,

- opcionalmente, uma rede ou microgrânulos que previnem a retração do coágulo sangüíneo e auxiliam na dispersão do sangue total,
- opcionalmente um gel, possivelmente compreendendo íons cálcio.

5 Opcionalmente, o kit também compreende as instruções para o uso a fim de fornecer as diretrizes específicas para realizar o método da presente invenção. Outras características da presente invenção e suas vantagens serão descritas nos exemplos e nas figuras que seguem.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10 Figura 1: Um Trombograma obtido a partir de um experimento de subamostragem. As características principais são: tempo lag (= tempo de coagulação), altura do pico e área sob a curva (= Potencial de Trombina Endógena, ETP).

15 Figura 2: Uma amostra das curvas de geração da trombina obtida no plasma pobre em plaquetas pela *trombinografia* automatizada calibrada.

AVK: tratamento de anti-vitamina K; TM: Trombomodulina.

Figura 3: Um esquema simplificado da formação da trombina: são apresentados *feedbacks* positivo e negativo.

20 Figura 4: representação esquemática dos efeitos da sedimentação e da retração do coágulo no sinal fluorescente a partir do sangue total de coágulo.

Legenda: larvas ovais: células sangüíneas vermelhas

Círculos estrelados: moléculas fluorescentes que são excitadas

Quadrados: moléculas fluorescentes que não são excitadas

25 Linha horizontal superior (c. q. curvado): fluido da superfície

Linha horizontal inferior: fundo transparente da cavidade de medida

Estágio A: fluido sangüíneo logo após o preenchimento da

cavidade (Figura 1, $t = 0$)

Estágio B: fluido sangüíneo pouco antes da coagulação (Figura 1, $t = B$)

Estágio C: sangue logo após a coagulação (Figura 1, $t = C$)

5 Estágio D: sangue após o início da retração (Figura 1, $t = D$)

Figura 5: ocular de Huygens e condensador

Figura 6: camada fina (3 mm) de sangue em cavidades de prato de microtitulação normal. Sete experimentos idênticos.

10 Figura 7: camada fina de sangue em uma ampla superfície de cavidades de prato de microtitulação.

32 pontos de leitura por cavidade de experimentos idênticos.

Figura 8: camada fina de sangue em uma ampla superfície de cavidades de prato de microtitulação com malha e cobertura. Um ponto de leitura através do dispositivo de coleta da luz (ocular de Huygens) (1) curva experimental, (2) após a correção para a $\alpha 2M$ -trombina.

Figura 9: unidades arbitrárias para a trombina.

Figura 10A: Projeto do cartucho da amostra que mostra um possível formato de um cartucho de medida de dois compartimentos. Uma peça fina (de preferência, rígida, por exemplo, vidro) de material (referido como "lâmina") possivelmente revestido com um revestimento com um revestimento biocompatível, é dividida em compartimentos com um espaçador apropriado. Este espaçador também pode agir como um eletrodo para detectar a injeção da amostra por resistência da gota e/ou aumento da corrente elétrica. Cada compartimento pode ser revestido com substâncias do tipo calibrador e/ou substrato (ou qualquer outra substância necessária como os inibidores e o fator do tecido). Uma segunda lâmina é ligada em cima de outra lâmina. O espaço entre as duas lâminas é de 5 a 1.000 μm , de preferência, de 50 μm .

O cartucho pode ser revestido em um ou mais lâminas por um

revestimento espelho dicróico apropriado permitindo a amplificação óptica. Isto permite que a luz excitada entre no cartucho, enquanto a emissão da luz é refletida dentro do cartucho (vide Figura 10B) e será concentrada a uma lâmina não revestida do cartucho.

5 Legenda da figura 10A:

1 - Lâmina de revestimento revestida com camada biocompatível;

2 - Lâmina de revestimento grande é dividida em dois compartimentos com fitas de dupla face;

3 - Dois compartimentos são revestidos com cálcio e/ou substrato e secos em baixo do nitrogênio;

4 - Espaçadores de metal são colocados na fita de dupla face. Esses espaçadores também atuam como eletrodo;

5 - Lâmina de revestimento pequena é viscosa no topo da fita de dupla face e eletrodos.

15 Figura 11: O projeto do cartucho alternativo mostra uma peça de matriz sólida, por exemplo, um polímero poroso ou celulose, que é colocada entre duas lâminas. Essa matriz pode conter substrato e/ou cálcio (ou qualquer outra substância do tipo fator do tecido, inibidores). Estas substâncias podem estar presentes junto com um solvente, na forma seca ou liofilizada.

20 Figura 12: mostra a curva TG medida em uma camada fina de sangue em uma célula de papel filtro, convertida a trombina nM por um calibrador Staphylocoagulase.

EXEMPLOS

(I) MEDIDA DO TG NO SANGUE TOTAL: O FENÔMENO OBSERVADO E AS

25 DIFICULDADES TÉCNICAS PARA A MEDIDA DO TG

Quando um substrato fluorogênico é utilizado, a fluorescência pode ser provocada e medida até o momento, apenas enquanto a luz não for interceptada por células sangüíneas vermelhas, isto é, no espaço do plasma

acessível à luz de excitação, que também é o espaço do qual a luz emitida pode ser observada. Para a finalidade da simplificação, assume-se que as células sanguíneas vermelhas são completamente impenetráveis a ambos os tipos de luz. Se, entretanto, até certo ponto o RBC for penetrável, fundamento
5 não precisa ser substancialmente alterado.

O sangue total forma um coagulo no final da fase de iniciação, isto é, no início do volume explosivo da geração de trombina. Na Figura 4, quatro estágios são ilustrados da situação da superfície superior e inferior do sangue, coagulando em uma cavidade de um prato do fluorímetro na presença de um substrato
10 fluorogênico e iluminado a partir do topo ou alternativamente do fundo.

No estágio A, o sangue agitado foi apenas colocado para descansar e as células sanguíneas vermelhas são homogeneamente dispersas no plasma fluído (Figura 4A). No curso do tempo lag, antes de ocorrer a sedimentação da coagulação (tipicamente de 3 a 12 minutos) das células
15 sanguíneas vermelhas; em cima mais plasma se torna acessível à luz e menos no fundo (Figura 4B). Assim que sangue coagula (Figura 4C), o *status quo* aumentado em B é “congelado” pela aparência do coagulo de fibrina. Por causa da ação da trombina nas plaquetas sanguíneas, a retração do coagulo se sedimenta assim que um coágulo é formado. A sedimentação e a retração
20 do coágulo são fenômenos que são visíveis a olho nu em uma escala mm por hora. No domínio do micrômetro, eles ocorrem em questão de minutos, isto é, na escala de tempo dos experimentos TG. A retração ocasiona uma distribuição desigual dos RBCs e também uma mudança na superfície, tal que ele deixa de ser plano, mas se torna ondulado. A ondulação ocasiona uma
25 partição desigual do plasma e do coágulo na superfície e causa efeitos ópticos não previsíveis. As irregularidades da superfície estão em uma escala de mm e visíveis a olho nu. Portanto, eles estão na mesma ordem de magnitude que o ponto de luz de excitação na fluorometria normal.

A sedimentação e a retração induzem uma mudança no volume do fluido em que as moléculas fluorescentes podem ser atingidas pela luz de excitação. Devido a esta mudança, o volume real em que a medida ocorre é variável e desconhecido. Portanto, a quantificação reprodutível da quantidade de trombina a partir da taxa de produção do sinal obtida nestas condições é impossível, mesmo se os efeitos da sedimentação e da retração fossem desprezíveis.

Os experimentos realizados pela utilização de cavidades de prato de microtitulação comum e um volume que preenche essas cavidades a uma altura normal (6mm) permitiu resultados satisfatórios a ser obtidos apenas em uma pequena porcentagem de todas as cavidades. Isto é explicado pelo fato de que na fluorometria comum, um sinal suficiente obtido apenas se o ponto da superfície medida (cerca de 4mm^2) coincidir com a área onde pode ser obtido sinal suficiente, pois está disponível plasma suficiente; isto é não acima de um coágulo-massa retraído, mas em um “vale” da superfície (vide Figura 4D). Os relatórios positivos na literatura da medida devem resultar de uma seleção cuidadosa dos dados obtidos. Nestes casos onde um sinal da forma correta é obtido, a medida quantitativa de trombina é impossível por causa do volume de medida que é desconhecido e variável. A medida a partir do fundo através de uma folha resolveria o problema das irregularidades da superfície, mas devido a sedimentação de RBC, o sinal se torna tão pequeno que ele some no ruído de fundo.

Foi observado que, com o preenchimento normal das cavidades de um prato de 96 cavidades de um tipo disponível na data, é possível obter um sinal interpretável em 1 ou 2 de 10 cavidades. Se as cavidades forem preenchidas a menos de 2 mm de altura como a altura normalmente útil, o sinal é obtido próximo em todas as medidas. Apesar disso, o sinal que é obtido desta maneira em um fluorímetro normal é bastante variável e pequeno, isto é,

corresponde de 1 a 5% do sinal obtido com plasma e mostra uma ampla razão sinal para ruído (Figura 6). Foi concluído que não há maneira prática de determinar o TG no sangue total utilizando as configurações ópticas de um fluorímetro normal.

5

II O PROJETO DO MÉTODO DA PRESENTE INVENÇÃO

(1) PRINCÍPIO DA INVENÇÃO

Inesperadamente, foi descoberto que (a) os efeitos da sedimentação e da retração diminuem progressivamente com a espessura da camada do sangue de coagulação e, (b) a medida da fluorescência a partir de
10 uma superfície mais ampla do que cerca de 10 mm^2 , tende a igualar as irregularidades remanescentes da superfície ocasionada pela retração. Igualmente de maneira inesperada, os efeitos da sedimentação e da retração podem ainda ser reduzidos ao conter o sangue em labirintos ou interstício, tal como uma rede de filtro (possuindo uma abertura de malha de 50 a $500 \mu\text{m}$) ou
15 esferas embaladas (de diâmetro de 50 a $500 \mu\text{m}$). Consequentemente, os depositantes fornecem condições para obtenção de um sinal fluorescente não perturbado a partir do produto de atividade de trombina ao permitir que a medida seja realizada em uma camada fina de sangue (especialmente inferior a 2 mm) espalhada sobre uma superfície mais ampla do que cerca de 10 mm^2 .

20

Para resolver o problema do volume desconhecido em que a reação é medida, os depositantes decidiram ainda não utilizar o substrato puro, mas ao invés, o substrato que já continha uma concentração de produto fluorescente fixa baixa, mas conhecida e prontamente mensurável.

(2) DISPOSITIVO ÓPTICO PARA MEDIDA

25

A medida sobre uma superfície mais ampla do que o normal requer dispositivos ópticos que permitam iluminar as superfícies amplas e coletar a luz emitida daquela superfície. Um dispositivo tal não é diferente de um ocular de Huygens, outro tipo um condensador microscópico (Figura 5).

Para aumentar o sinal fluorescente, o sangue pode ser espalhável em uma superfície refletora, e tal superfície pode ser uma parte integral do dispositivo descrito abaixo.

(3) DISPOSITIVO CONTENDO AMOSTRA DE SANGUE

5 O uso de um dispositivo que contém sangue nos interstícios de sua estrutura permite a simulação da situação do derramamento de sangue em uma ferida, ele pode ser feito para conter o fator do tecido, trombomodulina e outros elementos conhecidos existentes na parede dos vasos normais que afetam o processo de TG (por exemplo, colágeno). Para fins de comparação, o
10 material do qual o dispositivo é feito pode ser selecionado entre o material inerte, tal como, por exemplo, náilon, ou polipropileno.

Para evitar a secagem da superfície, a camada fina de sangue pode ser coberta por um filme fino de material sólido ou líquido. Alternativamente, o sangue pode ser guiado em uma fenda dentro de um
15 material translúcido, por exemplo, por uma força capilar.

(4) MEDIDA

É uma vantagem da medida em uma camada fina que o sinal fluorescente seja proporcional à concentração das moléculas fluorescentes; em outras palavras, o efeito do filtro interno não desempenha nenhum papel.
20 Entretanto, o consumo do substrato não desempenha um papel. Ele pode ser compensado de três maneiras: (a) como no método cromogênico (38), isto é, ao fornecer substratos com constantes cinéticas tal que o consumo de substrato possui um efeito desprezível, (b) ao corrigir matematicamente o consumo do substrato, isto é, pela aplicação da equação da taxa integrada e
25 (c) ao utilizar um calibrador conforme descrito na patente WO 03/093831.

O curso da concentração de trombina na coagulação do sangue total é determinado a partir da ação enzimática da trombina em um substrato fluorogênico adicionado ao sangue. Um sinal estável e suficiente foi obtido ao

medir em uma camada fina ilustrada por uma camada de menos de 2 mm de espessura sobre uma superfície ampla (ilustrada por uma superfície que possui mais de 10 mm²). Para medir o volume real em que a reação ocorre, uma pequena quantidade de fluoróforo é adicionada ao substrato. Um dispositivo
5 óptico especializado é requerido para a iluminação do todo da superfície e outra para coleta da luz emitida a partir da superfície.

A camada fina poderia ser estabilizada e evitada a partir da secagem por uma série de meios mecânicos, entre os quais uma rede inerte ou uma rede de material selecionado tal como para imitar certas propriedades da
10 parede do vaso. Alternativamente, uma pequena fenda pode ser utilizada.

A configuração também pode ser utilizada para medir a geração de trombina em plasma rico em plaqueta e pobre em plaqueta.

(5) MISTURA DA REAÇÃO

Substâncias químicas:

15 O fator do tecido relipidado recombinante (rTF) que não contém polibreno ou Ca⁺⁺ é da Dade Behring (Marburg, Alemanha). O substrato fluorogênico, Z-Gly-Gly-Arg-AMC é obtido pela Bachem (Suíça). Na divisão pela trombina, ela libera o 7-amino-4-metilcumarina (AMC) fluorescente que é medido por uma excitação de 390 nm e um conjunto de filtro de emissão de 460 nm.

20 Uma mistura fresca de substrato fluorogênico e CaCl₂ (FluCa) é preparado para cada experimento conforme segue: para 875 µL de tampão (Hepes 20 mM, pH 7,35) contendo 60 g/ L de BSA (Sigma, A-7030), 100 µL de CaCl₂ a 1 M foi adicionado. A 37° C, 25 µL de uma solução de DMSO a 100 mM do substrato fluorogênico foi respingado e imediatamente agitado de
25 maneira vigorosa. A solução clara resultante, referida como FluCa, portanto é de 2,5 mM em substrato fluorogênico e 100 mM em CaCl₂.

O tampão A contém 20 mM de hepes, 140 mM de NaCl, 5 mg/ mL de BSA, pH = 7,35.

O tampão B contém 20 mM de hepes, 140 mM de NaCl, 60 mg/mL, pH = 7,35.

SANGUE E PLASMA

O sangue é obtido através de uma punção na veia (1 volume de citrato trissódico a 0,13 M para 9 volumes de sangue). O fluxo livre da sucção mínima deve ser empregado; os recipientes a vácuo devem ser evitados.

As medidas são realizadas em um prato de fluorímetro (leitor Ascent, Thermolabsystems OU, Helsinki, Finlândia) equipado com um conjunto de filtro de 390/460 (excitação/ emissão). Ao invés de um prato de 96 cavidades, um prato de cavidade é utilizado com 24 cavidades redondas com um diâmetro de 15 mm e, portanto, uma superfície de 175 mm². As cavidades são preparadas ao lavar diversas vezes com o tampão A e ao secar as cavidades.

Então, a mistura do sangue e do substrato é adicionada em que a geração de trombina ocorre. A mistura contém, por cavidade a ser preenchida: 80 µL de sangue total citrado.

20 µL de Innovin® 1:1.000 diluído no tampão A, 20 µL de FluCa ou, como sendo o caso, um múltiplo destes volumes.

Imediatamente após a adição de FluCa, a mistura é agitada em um misturador Vortex e adicionada às cavidades. O prato é inserido no fluorímetro e agitado durante 10 s a 1.200 rpm e então, medido a cada dois minutos a 390/ 460 nm a 37° C durante uma hora.

Para cada cavidade de 120 µL, a mistura é adicionada.

EXEMPLO 1

PONTOS DE LEITURA MÚLTIPLOS, ADIÇÃO DA MALHA E DA COBERTURA

A geração da trombina foi desencadeada conforme indicado acima nas três cavidades. Os pontos de 24 cavidades foram iluminados um após o outro. Os sinais de 24 pontos a cada leitura foram adicionados. Os

resultados são mostrados na Figura 7. É observado que o sinal é aumentado e estabilizado pela adição de uma rede, onde um filtro de náilon com uma abertura de malha de 600 μM , 51% de área aberta e espessura de 445 μM (Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez Califórnia, EUA). Entretanto, o sinal aumenta de forma artificial com o tempo devido à evaporação e a concentração da camada superior. Isto é evitado pela cobertura com uma folha plástica (Fita selante de limpeza óptica Thermosprint para QPCR (Bilatec AG, Mannheim, Alemanha)).

EXEMPLO 2

MÚLTIPLOS PONTOS DE LEITURA, ADIÇÃO A UM GEL E UMA COBERTURA

A geração de trombina foi desencadeada conforme indicado acima em três cavidades. Os pontos de 24 cavidades foram iluminados e medidos um após o outro. Os sinais a partir de 24 pontos em cada leitura foram adicionados. Para duas cavidades, 700 μL de um Spehadex-25 a 50% (v/v) em solução de NaCl a 150 mM são adicionados e o pó é deixado assentar por 5 minutos. O sobrenadante (300 – 400 μL) é removido da cavidade com uma pipeta.

Então, 120 μL da mistura de sangue de coagulação são adicionados. Em cima de uma destas duas cavidades, foi aplicada uma folha plástica. (Fita selante de limpeza óptica Thermosprint para QPCR (Bilatec AG, Mannheim, Alemanha)). Os resultados são comparáveis a aqueles da Figura 7.

EXEMPLO 3

COLETA DA LUZ COM UM DISPOSITIVO ÓPTICO

Para este experimento, uma cavidade, com rede e cobertura como no Exemplo 1, conforme medido com o auxílio de um fluorímetro optima Fluostar (BGM Labtech, Offenburg, Alemanha). A luz a partir da amostra foi coletada em um ocular de Huygens (10 x de amplificação) e lida após passar através deste dispositivo óptico. Os resultados são mostrados na Figura 8.

EXEMPLO 4

DAS UNIDADES ARBITRÁRIAS PARA A TROMBINAS

Este experimento foi essencialmente realizado como aquele no Exemplo 1 com rede e cobertura, mas uma quantidade conhecida de AMC (10 nM) foi adicionada ao substrato Z-Gly-Gly-Arg-AMC. Devido à sedimentação dos eritrócitos, o volume em que a medida ocorre aumenta tal que o sinal a partir do AMC presente aumenta. No momento da coagulação, a situação “congela” e nenhuma sedimentação ocorre. Neste momento, conhecido a partir de um repentino aumento no sinal, nós medimos a quantidade de fluorescência devido ao AMC a 10 nM adicionado. Desta forma, nós conhecemos como converter as unidades de fluorescência (F) na concentração de AMC. Assim, o dF/dt medido pode ser convertido em $d[AMC]/dt$. A partir de um experimento independente, sabe-se o que $d[AMC]/dt$ corresponde ao qual concentração de trombina. Assim, a velocidade de mudança da fluorescência (Figura 9, linha preta) pode ser convertida na concentração de trombinina da amostra.

EXEMPLO 5

DISPOSITIVO CONTENDO A AMOSTRA DE SANGUE

Uma célula de filtro de papel contendo substrato e íons Ca^{2+} é preparada pela adição de 50 μL de uma solução de DMSO a 100 mM do substrato fluorogênico e 100 μL de uma solução de $CaCl_2$ a 1M para 5.850 μL de etanol. 11 μL desta solução é espalhada em um pedaço de matriz sólida (Whatman 1MM de papel de cromatografia) de 7x9 mm e seca sob nitrogênio. Depois é coberta entre os pedaços de plástico (Fita selante de limpeza óptica Thermosprint para QPCR (Bilatec AG, Mannheim, Alemanha)) conforme mostrado na Figura 11.

O mesmo procedimento é utilizado para preparar uma célula de papel filtro contendo apenas substrato, neste caso, 50 μL de uma solução de DMSO de 100 mM de substrato fluorogênico é adicionado a 5.950 μL de etanol,

do qual 11 μ L é espalhado em um pedaço de matriz sólida e seco sob nitrogênio.

MÚLTIPLOS PONTOS DE LEITURA, UTILIZANDO UMA CÉLULA DE PAPEL FILTRO

5 Duas células de papel filtro, uma contendo substrato fluorogênico e íons cálcio (A) e outra contendo apenas substrato (B) foram preparado de modo fresco conforme descrito acima.

Uma mistura 4:1:1 de sangue total citrado, tampão B e Innovin® (1:1.000 diluído em tampão A) foi preparada. Como um calibrador, uma mistura de 4:1:1 de sangue total citrado, inibidor de polimerização (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH . AcOH) (Bachem feinchemikalien AG, Bubendorf, Suíça) em tampão B (1,0
10 mM) e 20 μ M de staphylocoagulase foi preparado pela mistura de sangue total e inibidor da polimerização. Pouco antes de iniciar o experimento, a Staphylocoagulase foi adicionada e a amostra foi bem misturada.

15 Imediatamente após a adição de Staphylocoagulase, o experimento é iniciado pela adição de 11 μ L de amostra de TG à célula A e 11 μ L do calibrador à célula B. Isto é feito pela pipetagem das gotas próximo à matriz sólida em uma maneira que a gota toca a matriz (vide Figura 11) e é absorvida pelas forças capilares. Por célula, 4 pontos são iluminados e medidos um após o outro.

20 O sinal do calibrador é uma linha reta, a inclinação é utilizada para converter o sinal da célula da amostra em trombina nM. Esta é a calibração de sinal convencional como é conhecido no estado da técnica e não a calibração contínua como na acepção do pedido de patente EP 03/04705. Os resultados são mostrados na Figura 12.

25

REFERÊNCIAS

1. Loeliger EA. The optimal therapeutic range in oral anticoagulation.

History and proposal. Thromb Haemost 1979; 42:1141-52.

2. A double-blind trial to assess long-term oral coagulant therapy in elderly patients after myocardial infarction. Report of the Sixty Plus Reinfarction Study Research Group. *Lancet* 1980; 2: 989-94.
3. Engelberg H. Heparin and atherosclerosis. A review of old
5 and recent findings. *Am Heart J* 1980; 99:359-72
4. MArongiu F, Biondi G, Sorano GG, Mameli G, Conti M, MAmusa AM, CAdoni MC, Balestrieri A. Bleeding time is prolonged during oral anticoagulant therapy. *Thromb Res* 1990; 59:905-12.
5. Schulman S, Johnsson H. Heparin, DDAVP and the
10 bleeding time. *Thromb Haemost* 1991; 65: 242-4.
6. Sjolín KE. The thrombin generation test in the diagnosis of classical hemophilia and Christmas disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1956; 8:138-44.
7. Peyrou V, Lormeau JC, Herault JP, Gaich C, Pflieger AM,
15 Herbert JM. Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood. *Thromb Haemost* 1999; 81:400-6.
8. Giesen PL, Nemerson Y. Tissue factor on the loose. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:379-84.
9. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M,
20 Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2311-5.
10. Hemker HC. Platelet procoagulant activities: the amplification loops between platelets and the plasmatoclotting system. In
25 *Platelets*, Gresele, Page and Fuster eds. 2002; Cambridge University Press: 381-392.
11. Beguin S, Keularts I, AL Dieri R, Bellucci S, Caen J, Hemker HC. Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-

rich plasma in a VWF-GPIIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost* 2004; 2:170-6.

12. Beguin S, Kumar R, Keularts I, Seligsohn U, Collier BS, Hemker HC. Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIIb
5 receptors and von Willebrand factor. *Blood* 1999; 93:564-70.

13. Kessels H, Béguin S, Andree H, Hemker HC. Measurement of thrombin generation in whole blood – the effect of heparin and aspirin. *Thromb Haemost* 1994; 72:78-83.

14. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC,
10 Collier BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/ human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and 'clinical restenosis'. *J Clin Invest* 1996; 98:863-74.

15. Keularts IM, Beguin S, de Zwaan C, Hemker HC. Treatment with a GPIIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients. *Thromb Haemost* 1998; 80:370-1.

16. Herault JP, Dol F, Gaich C, Bernat A, Herbert JM. Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat. *Thromb Haemost* 1999; 81:957-60.

20 17. Prevention of Pulmonary embolism and deep vein thrombosis with low dose aspirin: Pulmonary Embolism Prevention (PEP) trial. *Lancet* 2000; 355:1295-302.

18. Rotteveel RC, Roozendaal KJ, Eijssman L, Hemker HC. The influence of oral contraceptives on the time-integral of thrombin generation
25 (thrombin Potential). *Thromb Haemost* 1993; 70:959-62.

19. Rosing J, Hemker HC, Tans G. Molecular biology and pathophysiology of APC resistance: current insights and clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24:329-35.

20. Regnault V, Beguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2003; 89:208-12.
- 5 21. Redondo M, Watzke HH, Stucki B, Sulzer I, Biasiutti FD, Binder BR, Furlan M, Lammle B, Wuillemin WA. Coagulation factors II, V, VII, and X, prothrombin gene 20210G → A transition, and factor V Leiden in coronary artery disease: high factor V clotting activity is an independent risk factor for myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1020-5.
- 10 22. Burzotta F, Leone AM, Paciaroni K, De Stefano V, Rossi E, Testa L, Giannico F, Leone G, Maseri A, Crea F, Andreotti F. G20210A prothrombin gene variant and clinical outcome in patients with a first acute coronary syndrome. *Haematologica* 2004; 89:1134-8
- 15 23. Burzotta F, Paciaroni K, De Stefano V, Crea F, Maseri A, Leone G, Andreotti F. G20210A prothrombin gene polymorphism and coronary ischaemic syndromes: a phenotype-specific meta-analysis of 12 034 subjects. *Heart* 2004; 90:82-6
- 20 24. French JK, Van de Water NS, Sutton TM, Lund M, Gao W, McDowell J, Liu-Stratton Y, Pohorence J, Szymanski D, Goldschmidt-Clermont P, White HD, Browett PJ, Cooke G. Potential thrombophilic mutations/polymorphisms in patients with no flow-limiting stenosis after myocardial infarction. *Am Heart J* 2003; 145:118-24
- 25 25. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995; 332:635-41
26. Soskin P, Wiesel ML, Mossard JM, Arbogast R, Najib K, Grunebaum L, Sacrez A, Cazenave JP. [Von Willebrand factor in coronary

disease]. Arch Mal Coeur Vaiss 1994; 87:85-93.

27. Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. Pathophysiol Haemost Thromb
5 2003; 22:52-8.

28. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet rich plasma. Thromb Haemost 2003; 90:781-6.

29. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann L. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15:241-4.
10

30. Keularts IM, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Beguin S. The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. Thromb Haemost 2001; 85:1060-5.

31. Keularts IM, Hamulyak K, Hemker HC, Beguin S. The effect of DDAVP infusion on thrombin generation in platelet-rich plasma of von Willebrand type 1 and in haemophilia A patients. Thromb Haemost 2000; 84:638-42.
15

32. Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Beguin S, Hemker HC. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. Thromb Haemost 2002; 88:576-82.
20

33. Hemker HC, Beguin S. Phenotyping the clotting system. Thromb Haemost 2000; 84:747-51.

34. Kessels H, Kester AD, Hemker HC. Intrinsic and method-induced variation of the bleeding time related parameters. Thromb Haemost 1994; 71:798-9.
25

35. Biggs R, Mac FR. The reaction of haemophilic plasma to thromboplastin. J Clin Pathol 1951; 4:445-59.

36. Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG. The formation of thromboplastin in human blood. *J. Physiol* 1953; 119:89-101.

37. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J. Clin* 1953; 6:3-8.

5 38. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993; 70: 617-24.

39. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000; 83:589-91.

10

40. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:249-53.

15 41. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33:4-15.

42. Hemker HC, Béguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* 1995; 74:134-8.

20

43. Hemker HC, Al Dieri R, Béguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 2004; 11:170-5.

44. Ramjee MK. The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. *Anal Biochem* 2000; 277:11-8.

25

45. Lo K, Diamond SL. Blood coagulation kinetics: high throughput method for real-time reaction monitoring. *Thromb Haemost* 2004; 92:874-82.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE TROMBINA EM UMA AMOSTRA, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra de sangue e a geração da trombina é medida
5 pelas etapas de:

- colocar uma camada de dita amostra em contato com um substrato fluorogênico da trombina em que dita camada possui uma espessura dentro de um intervalo de 0,05 a 5 mm e uma superfície dentro de um intervalo de 10 a 500 mm²;

10 - permitir a geração de trombina em dita amostra;

- medir a fluorescência emitida a partir da superfície da camada, pelo grupo fluorescente liberado a partir do substrato fluorogênico como um resultado da ação enzimática da trombina gerada em dito substrato fluorogênico.

15 2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de trombina gerada durante o ensaio é determinada como uma função da fluorescência medida do grupo fluorescente liberado.

20 3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue total é diluída dentro de um intervalo de no máximo 10 vezes.

4. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a espessura da camada da amostra é de cerca de 2 mm ou menos.

25 5. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que, para o ensaio, a amostra de sangue é preenchida dentro de uma cavidade de um prato que também contém uma rede com um tamanho de malha de 50 a 500 µm.

6. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que, para o ensaio, a amostra de sangue é preenchida dentro de uma cavidade de um prato que também contém microgrânulos.

5 7. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a cavidade contendo a amostra de sangue é coberta para a determinação da atividade de trombina.

8. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que um fluoróforo é adicionado ao substrato fluorogênico da trombina, em que as respectivas proporções do fluoróforo adicionado estão no intervalo de 1 a 10% da quantidade de molécula fluorescente ligada ao substrato de trombina.

9. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a quantidade de substrato de trombina adicionada à amostra está dentro de um intervalo de 50 a 1.000 μm .

10. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o substrato fluorogênico é um substrato sintético para a trombina, acoplada com uma molécula fluorescente.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o substrato de trombina que é hidrolisado seletivamente pela trombina, possui uma afinidade de ligação moderada para a trombina e uma baixa constante de cinética.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o substrato fluorogênico é um oligopeptídeo que possui uma seqüência de 2 a 30 resíduos de aminoácidos acoplados à molécula fluorescente.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o oligopeptídeo possui uma lisina ou arginina

terminal para o acoplamento com uma molécula fluorescente.

14. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 10 a 13, caracterizado pelo fato de que a molécula fluorescente é o AMC (7-amino-4-metilcumarina).

5 15. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a cavidade compreende ainda um gel, possivelmente contendo íons cálcio, em que dito gel não permite a diluição do sangue da amostra.

10 16. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o fator do tecido e os íons cálcio são adicionados à amostra de sangue em quantidades que permitem que ocorra a geração da trombina.

15 17. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue é uma amostra de sangue total.

18. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue é uma amostra de plasma, em especial de Plasma Rico em Plaqueta (PRP).

20 19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue total é citrada.

20. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 19, caracterizado pelo fato de ser para a detecção ou monitoramento de uma doença homeostática ou uma doença trombótica.

25 21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ser para a detecção ou monitoramento da interação de determinada(s) substância(s) na atividade de trombina em uma amostra de sangue total, em que dita(s) substância(s) determinada(s) é(são) adicionada(s) à amostra a ser analisada ou é(são) adicionada(s) durante a geração da trombina.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ser para o monitoramento da interação dos fatores de coagulação ou drogas.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ser para a seleção de substâncias para determinar sua capacidade de interação com a geração de trombina.

24. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 20, caracterizado pelo fato de ser para a medida do Potencial de Trombina Endógena (ETP) da amostra de sangue total.

25. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizado pelo fato de ser para a medida do tempo do pico da trombina.

26. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 22, caracterizado pelo fato de ser para a medida do tempo de coagulação.

27. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 23, caracterizado pelo fato de ser para a medida do nível do pico de trombina gerada.

28. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 24, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de calibração.

29. KIT para a realização do método conforme descrito em uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizado pelo fato de que compreende:

- um substrato fluorogênico para a trombina,
- o fator do tecido e os íons cálcio para permitir a geração da trombina,
- opcionalmente, uma rede ou microgrânulos que previnem a retração do coágulo sangüíneo e auxiliam na dispersão do sangue total,
- opcionalmente um gel, possivelmente compreendendo íons cálcio.

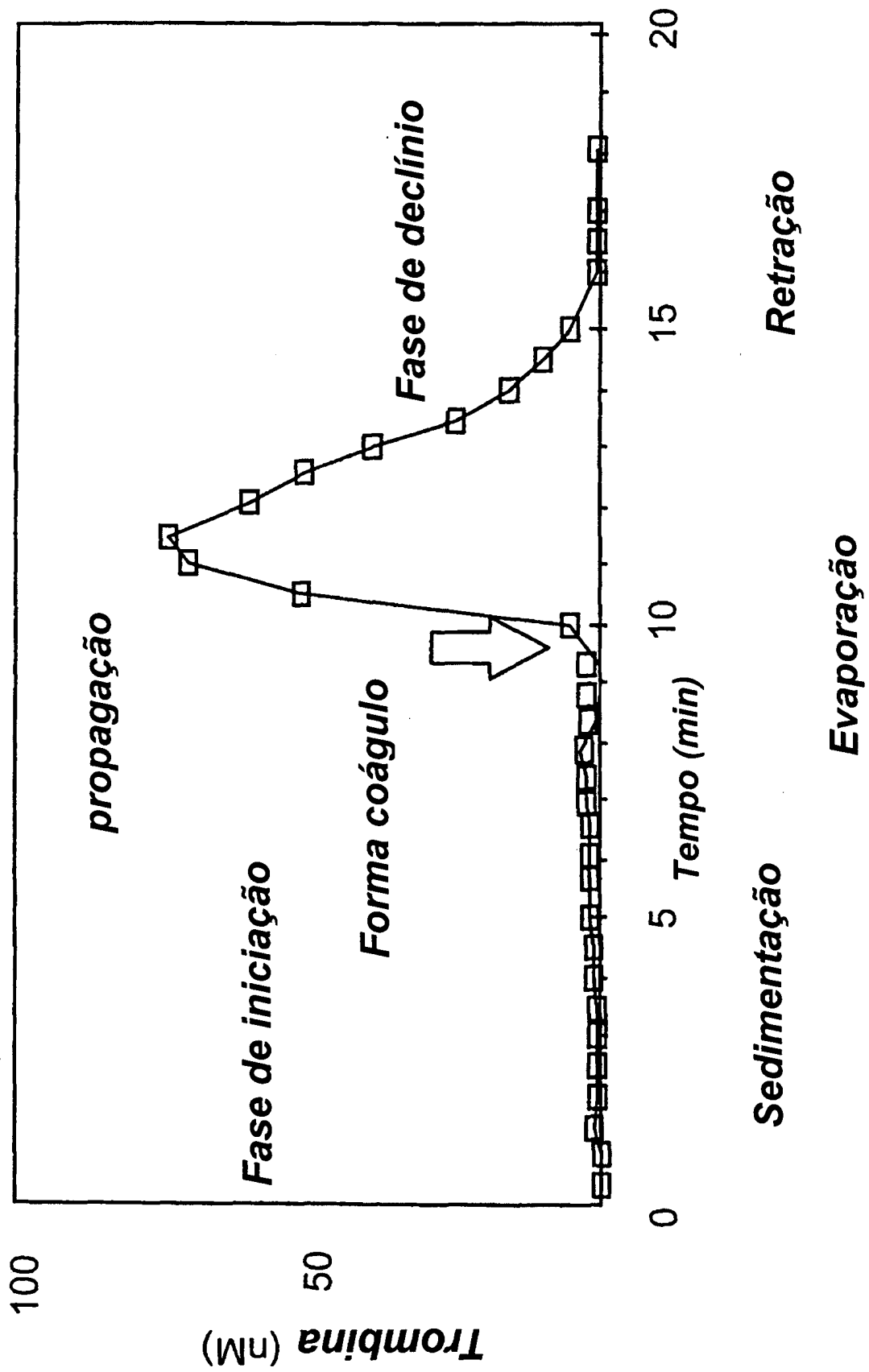
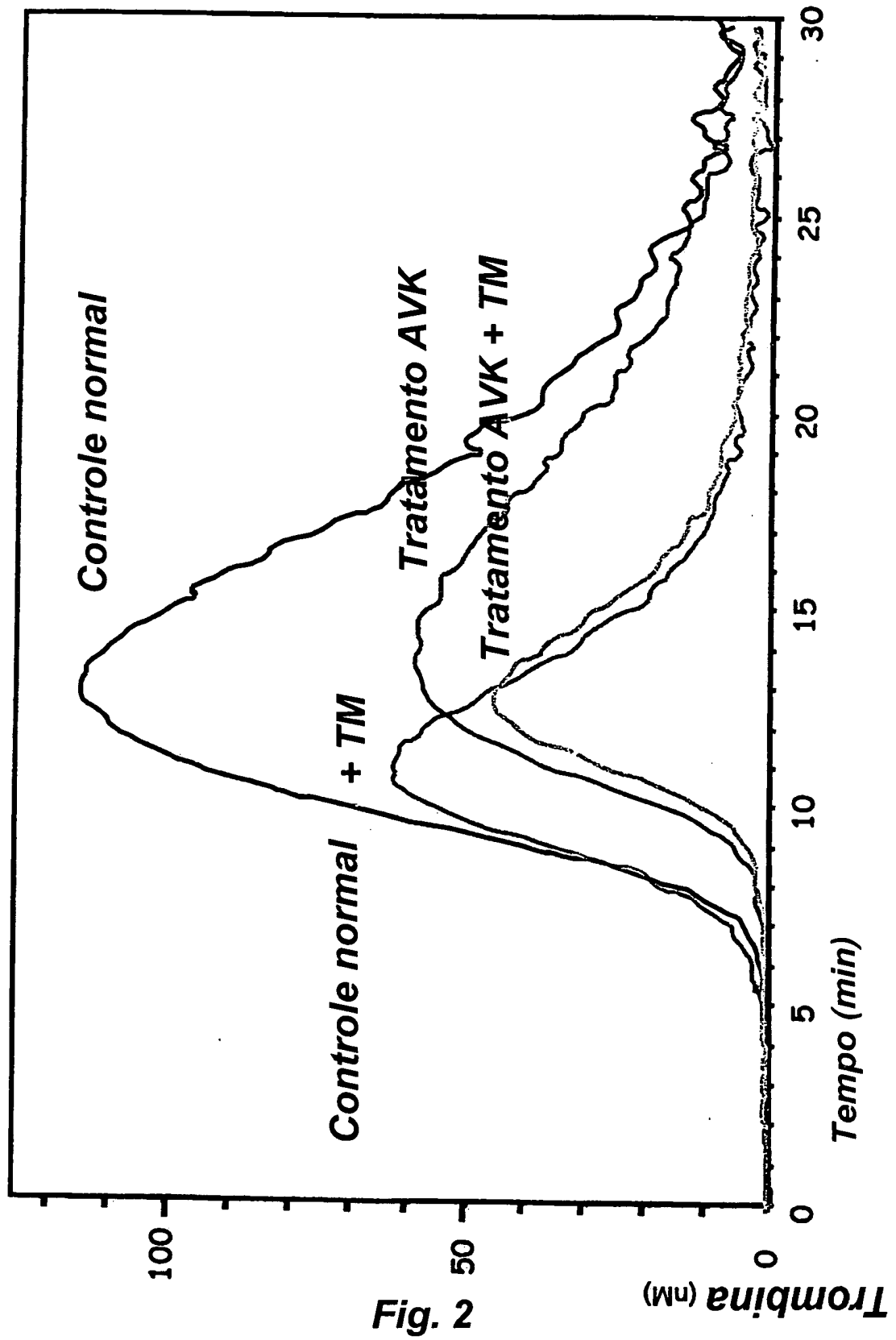


Fig. 1

AVK – Exemplo de interações complicadas



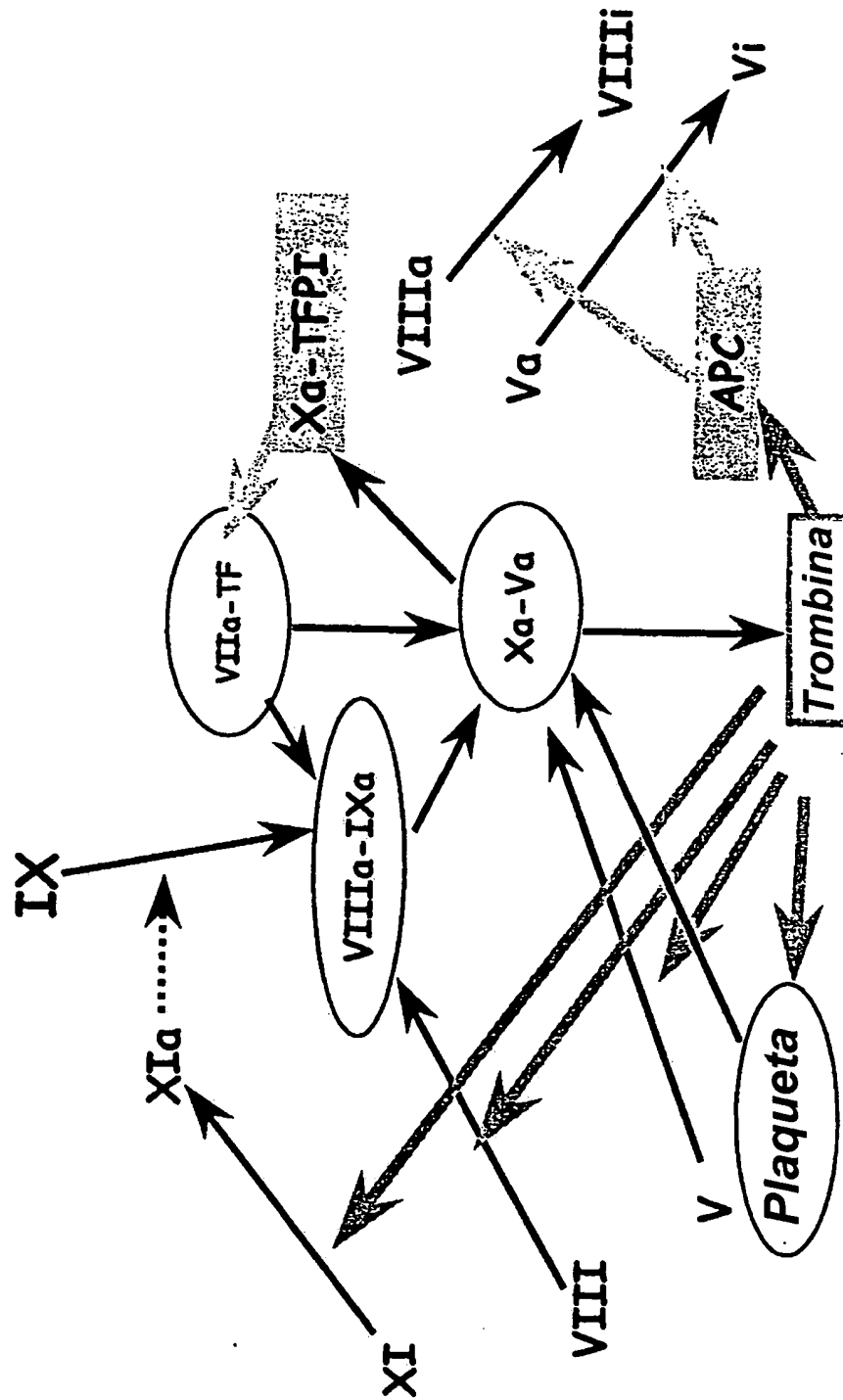
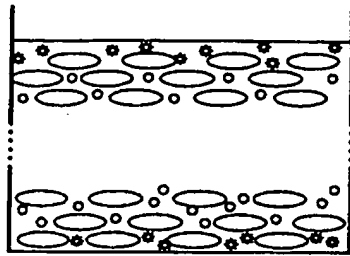
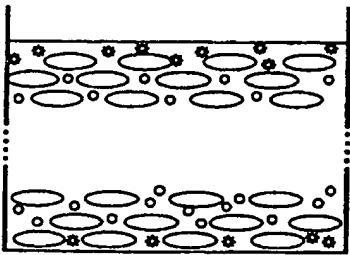


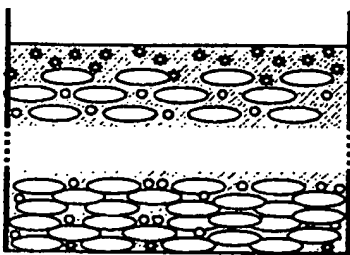
Fig. 3



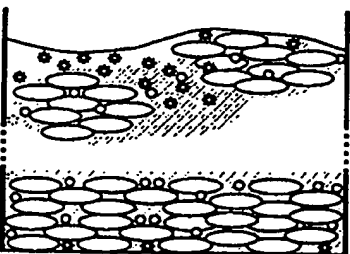
Estágio A



Estágio B



Estágio C



Estágio D

Fig. 4

Melhora o sinal / barulho através da medida sobre uma superfície grande?

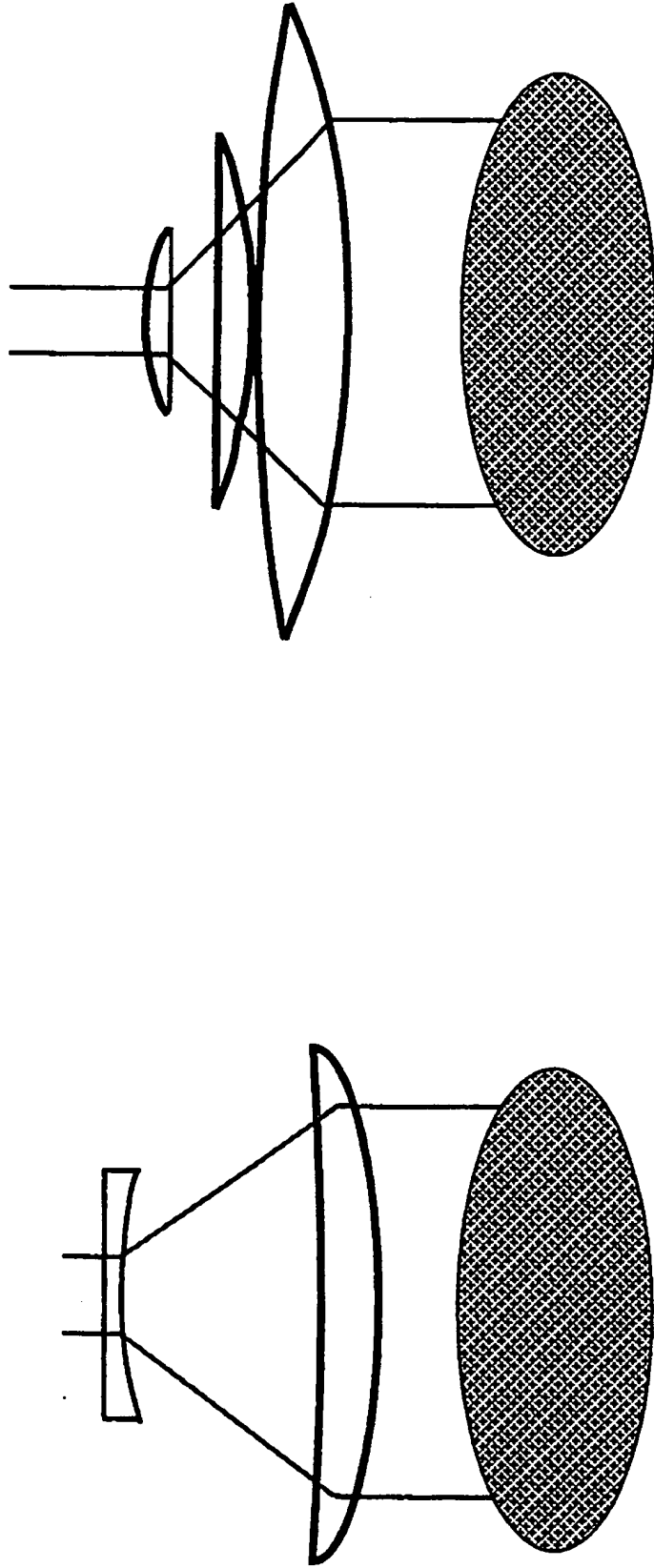
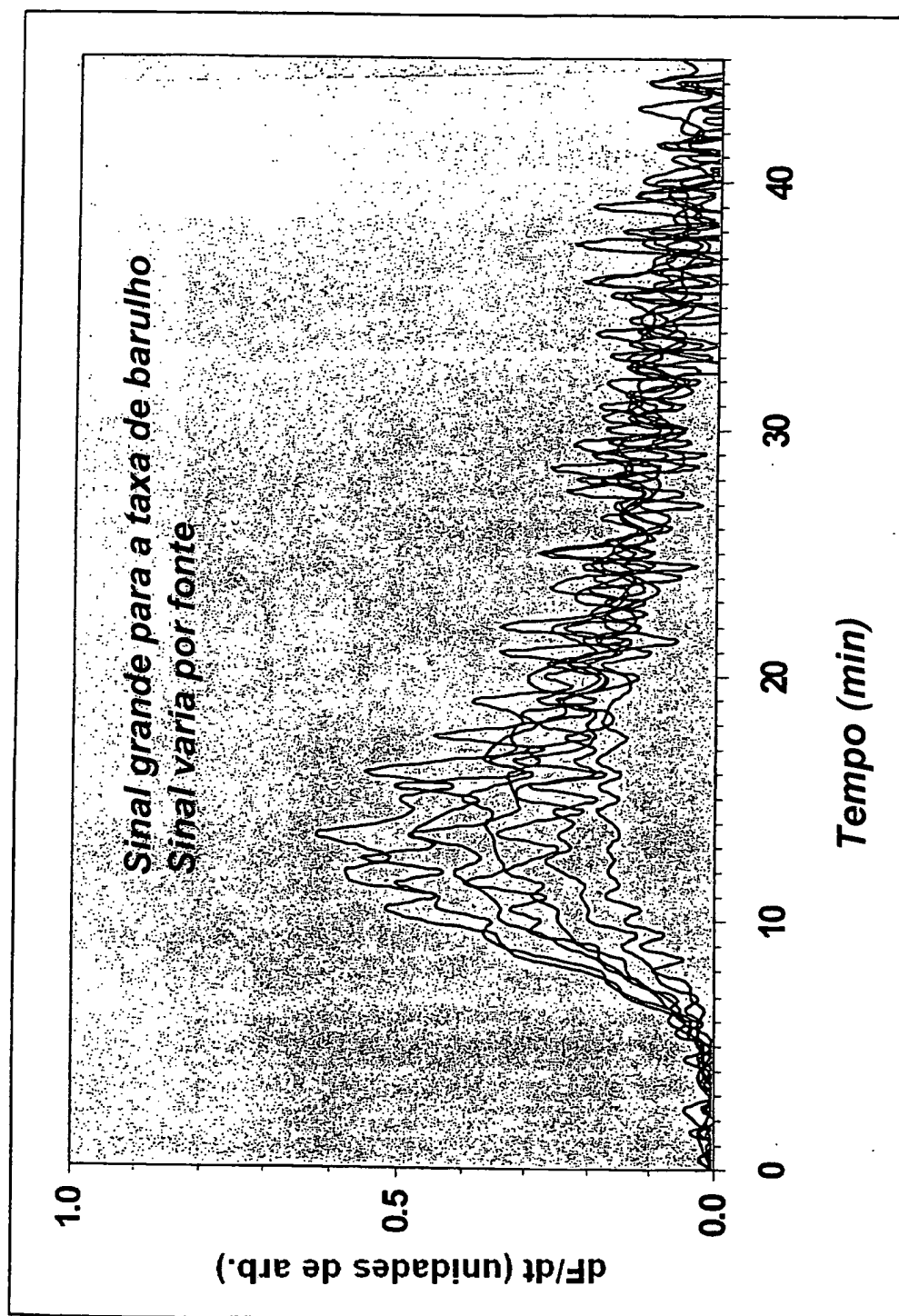
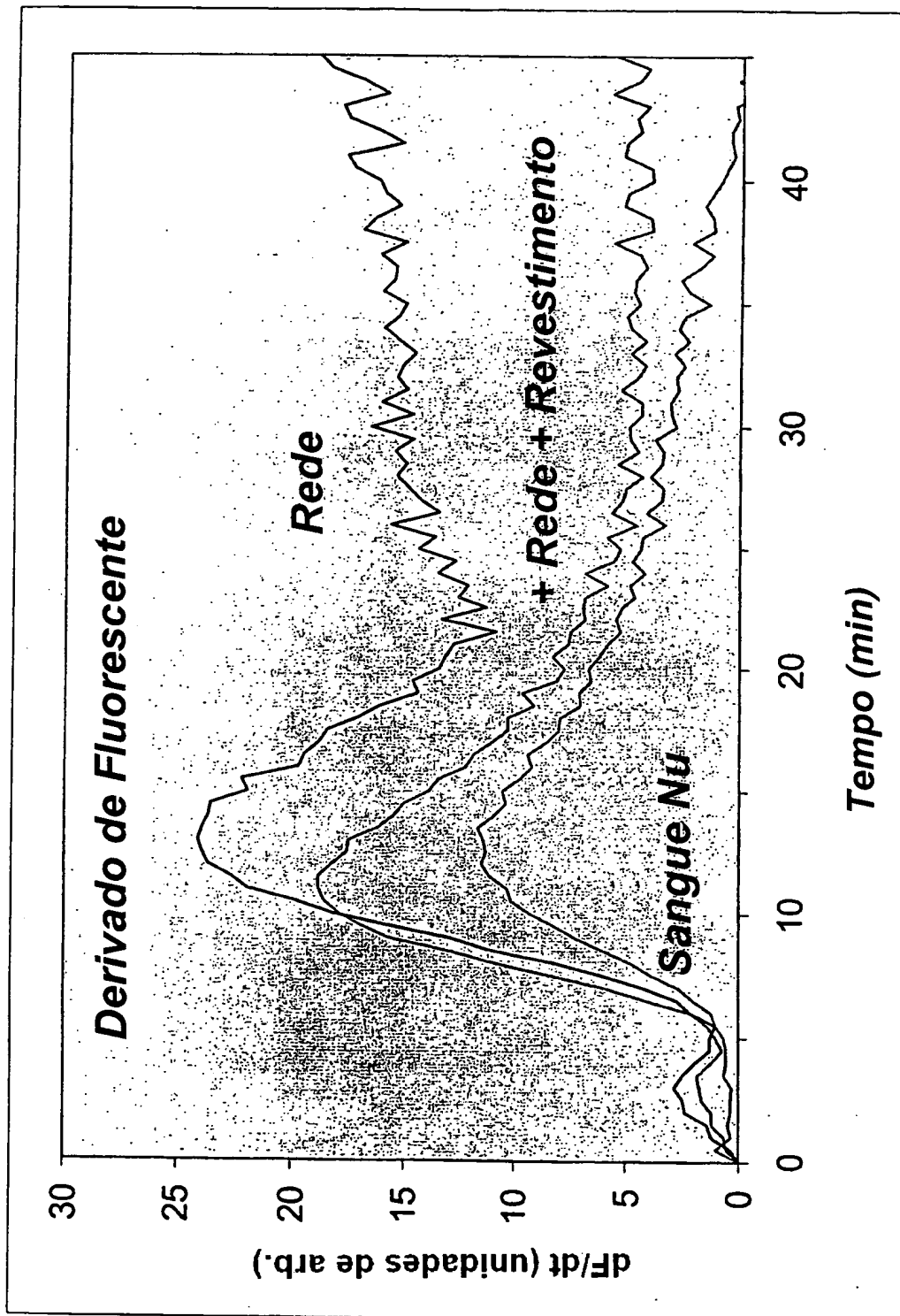
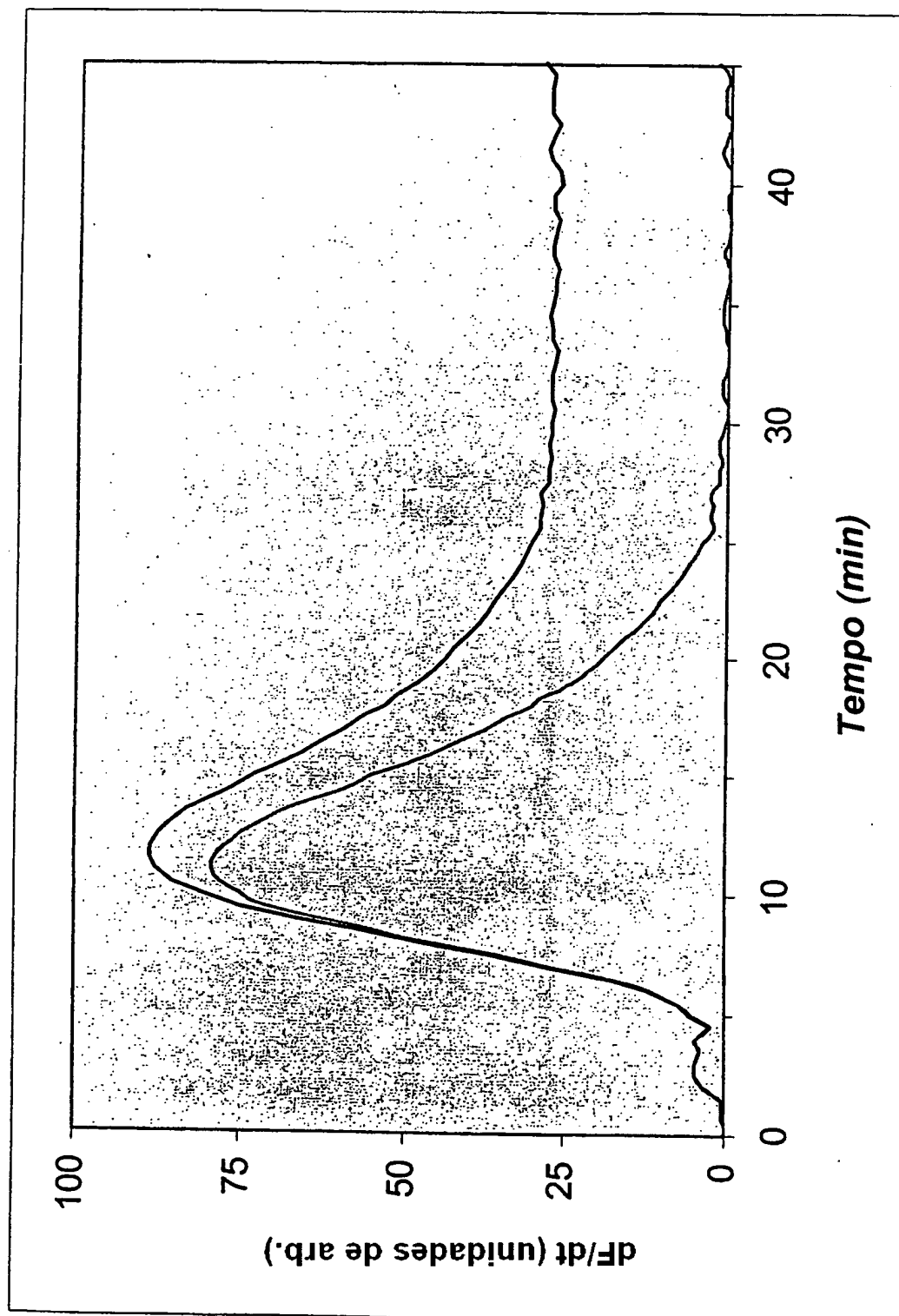
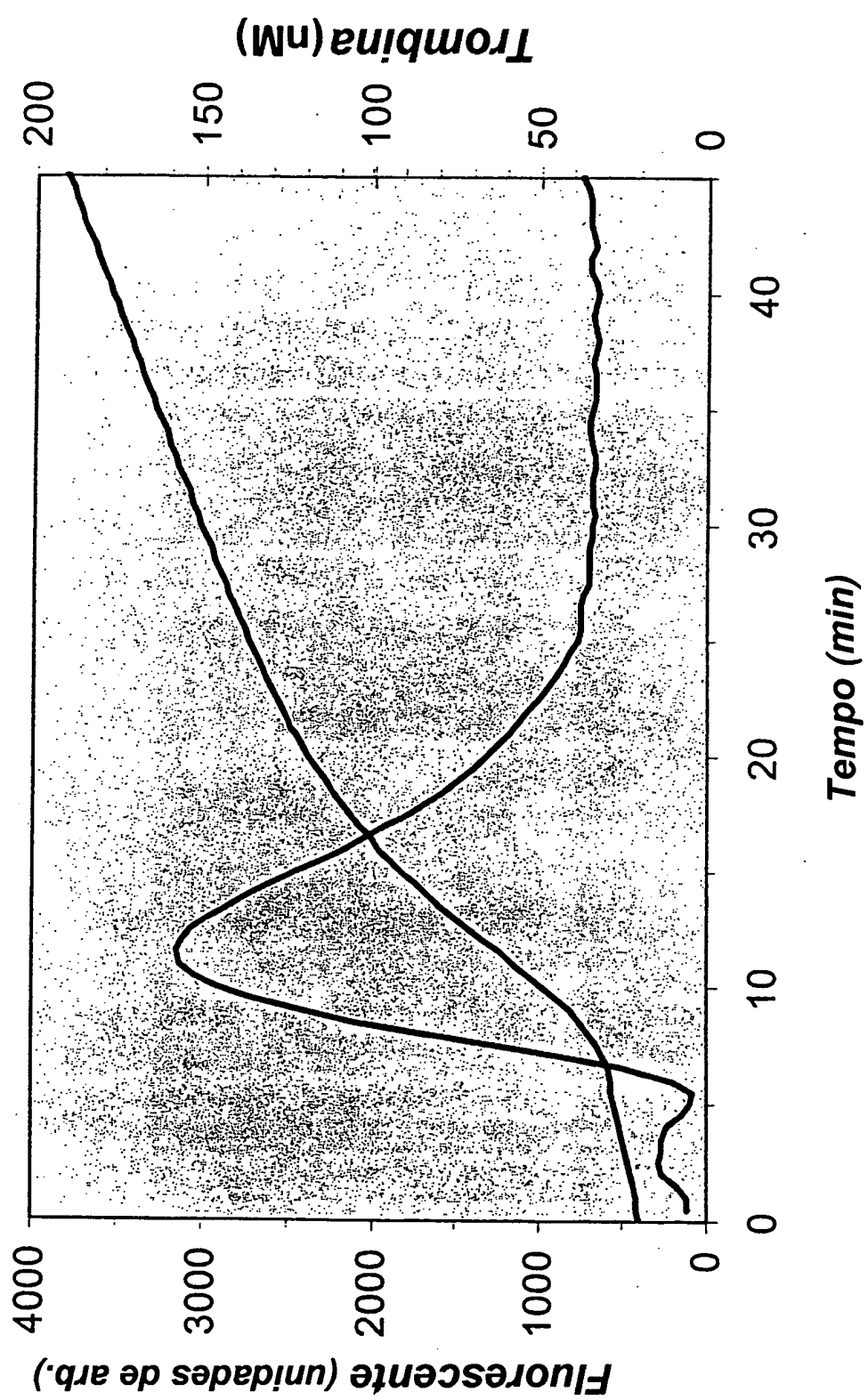


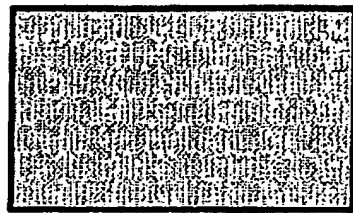
Fig. 5

**Fig. 6**

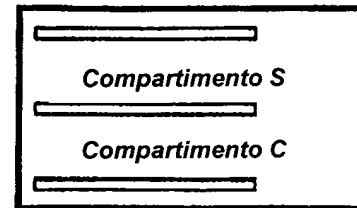
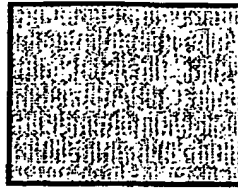
**Fig. 7**

**Fig. 8**

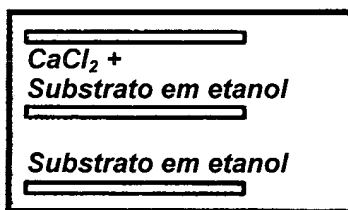
**Fig. 9**



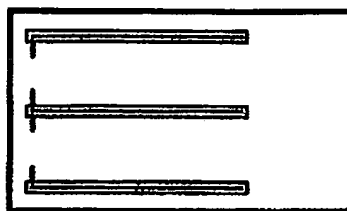
1



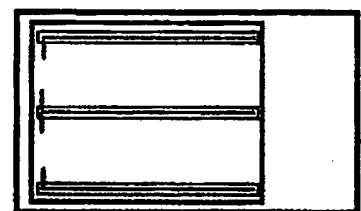
2



3

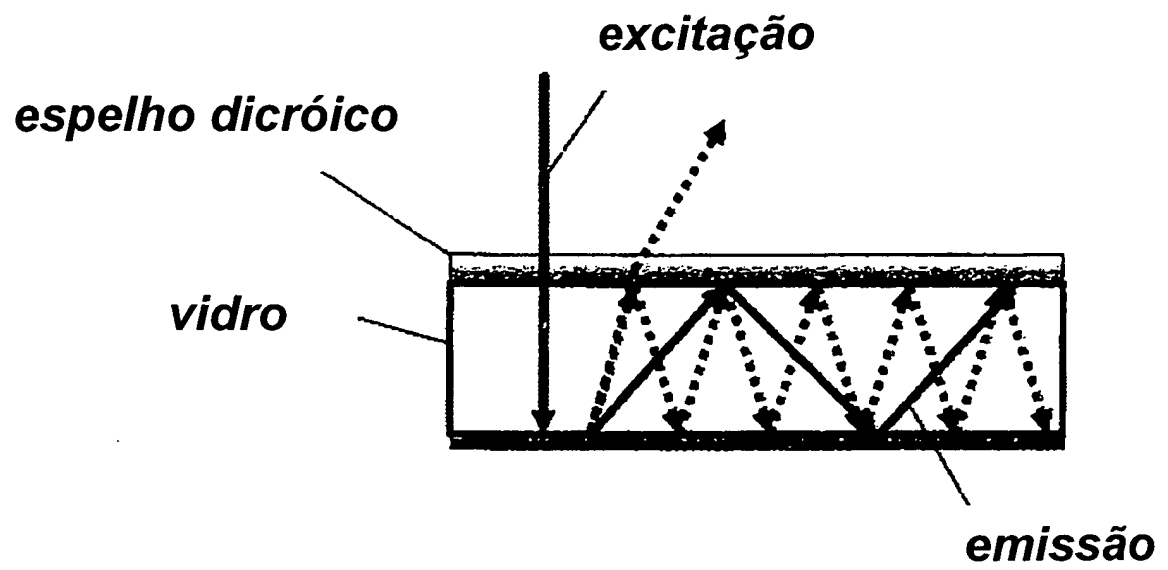


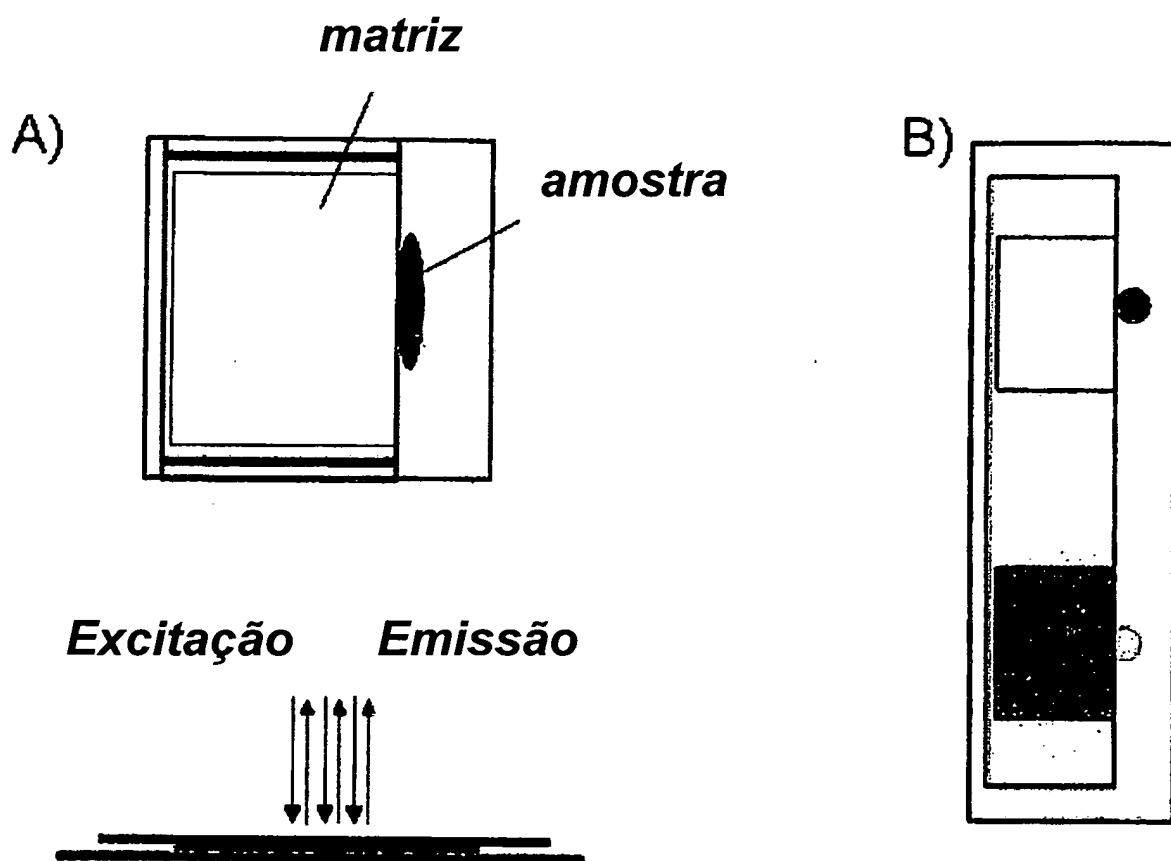
4



5

Fig. 10A

**Fig. 10B**

*Fig. 11*

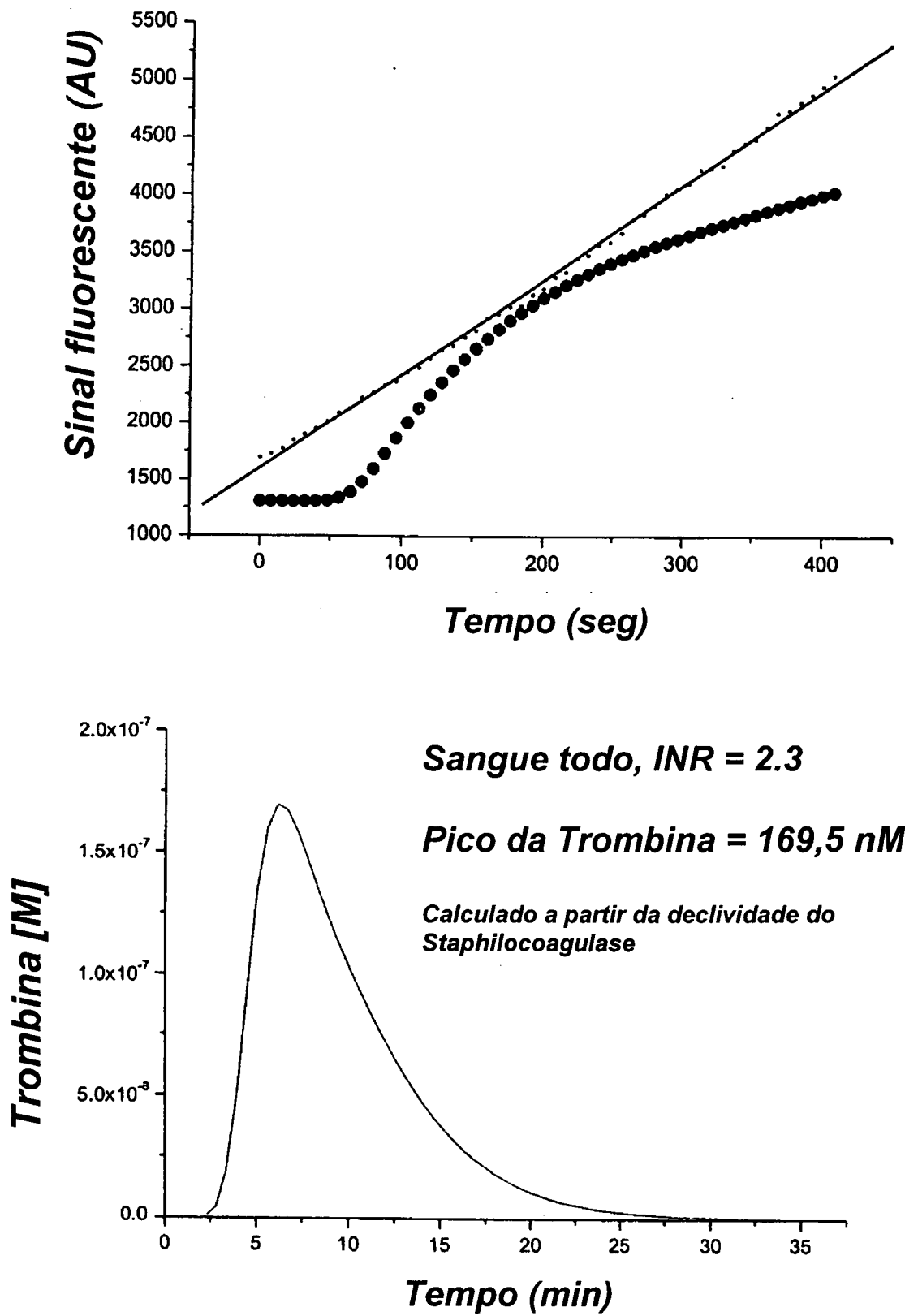


Fig. 12

RESUMO

“MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE TROMBINA EM UMA AMOSTRA E KIT”

A presente invenção refere-se a um método para a determinação *in vitro* da atividade da trombina em uma amostra, em que a amostra é uma amostra sangüínea e a geração da trombina é medida pelas etapas de: colocar uma camada de dita amostra em contato com um substrato fluorogênico da trombina, em que dita camada possui uma espessura dentro de um intervalo de 0,05 a 5 mm e uma superfície dentro de um intervalo de 10 a 500 mm²; permitir a geração de trombina em dita amostra; medir a fluorescência emitida a partir da superfície da camada, pelo grupo fluorescente liberado a partir do substrato fluorogênico como um resultado da ação enzimática da trombina gerada em dito substrato fluorogênico.