



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 808**

51 Int. Cl.:
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06014877 .2**

96 Fecha de presentación : **18.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1752772**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Procedimiento para determinación de heparina, basada en un factor Xa, utilizando un componente modificador de heparina.**

30 Prioridad: **12.08.2005 DE 10 2005 038 418**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.03.2011

73 Titular/es: **SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GmbH
Görzhäuser Hof Emil-Von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es: **Zander, Norbert y
Klein, Wolfgang**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

DESCRIPCION

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HEPARINA, BASADA EN UN FACTOR XA, UTILIZANDO UN COMPONENTE MODIFICADOR DE HEPARINA

5 La presente invención se enmarca en el sector de diagnóstico de coagulación y comprende un procedimiento in vitro para determinar la actividad heparínica en una muestra.

Las heparinas son cadenas de glucosaminoglicanos de carga negativa, polisulfatadas, de diferente longitud, y pertenecen a las sustancias anticoagulantes más difundidas que inhiben inmediatamente, y dependiendo de la concentración, la coagulación in vivo e in vitro. Según la longitud de cadena, se distinguen, básicamente, las denominadas heparinas no fraccionadas, de alto peso molecular (HUF, heparina UF), con un peso molecular de entre 3 000 y 30 000 Dalton y las denominadas heparinas fraccionadas, de bajo peso molecular (HLMW, heparinas LMW) con un peso molecular de entre, aproximadamente, 4 000 y 9 000 Dalton. Las heparinas fraccionadas en general se obtienen por disociación enzimática o química, o por cromatografía, a partir de heparina no fraccionada. Según el método de disociación, para estos productos se obtienen diferentes características físico-químicas, como una longitud de cadena media, distribución de del peso molecular, grado de sulfatación o modificaciones de glicano, que presentan una influencia en la actividad biológica de estos productos. Los derivados de la heparina y los heparinoides son cadenas de glucosaminoglicano enzimática y/o químicamente modificadas, cuyas características anticoagulantes se pueden modificar biotecnológicamente a través de la influencia adecuada de la longitud de la cadena de glicano, modelo de sulfatación o acetilación, o la mezcla de diferentes glucosaminoglicanos, por ejemplo, en el caso del Danaparoid sódico, una mezcla de glicosaminoglicanos formado predominantemente por sulfato de heparan y en una proporción inferior, sulfato de dermatan y sulfato de condroitina.

El efecto anticoagulante de todas las heparinas se basa en su complejización con antitrombina (AT, antitrombina III), el principal inhibidor plasmático de factores activados de coagulación. La antitrombina pertenece al conjunto de inhibidores de la serin-proteasa (Serpin) e inhibe los factores de coagulación trombina (factor IIa, FIIa) y factor Xa (FXa), así como, en menor medida, también las demás serin-proteasas FIXa, FXIa, FXIIa, calicreína y plasmina. Gracias al enlace de heparina y antitrombina se obtienen las modificaciones en la conformación de antitrombina, que intensifica varias veces el efecto inhibidor de la antitrombina. El punto de enlace en las moléculas de heparina, responsable del enlace de la antitrombina, consiste en una secuencia característica de pentasacáridos. La forma completamente sintética de este pentasacárido (Fondaparinux) también es utilizado, al igual que la HUF o la HLMW, para la inhibición medicamentosa de la capacidad de coagulación.

Las heparinas no fraccionadas y las heparinas fraccionadas, los derivados de heparina, heparinoides o pentasacáridos se diferencian en su efecto anticoagulante. Mientras que la trombina HUF y FXa inhiben del mismo modo, las HLMW presentan un efecto predominantemente inhibidor de FXa y sólo en menor medida un efecto inhibidor de trombina. Los pentasacáridos, como el Fondaparinux, inhiben selectivamente el FXa y no presentan un efecto inhibidor de trombina.

Acorde a la indicación, las heparinas se utilizan de modo profiláctico o terapéutico, por ejemplo, para la profilaxis de tromboembolias en situaciones de riesgo, o en el caso de inmovilización, para la terapia de episodios tromboembólicos ya iniciados o también en el caso de procedimientos terapéuticos extracorporales, como hemodiálisis, bypass cardiopulmonar o cateterismo cardíaco. Dado que el efecto anticoagulante de la heparina está supeditado a una serie de magnitudes de influencia individuales, por ejemplo, el peso corporal o las funciones del hígado y de los riñones, y una dosificación errónea puede desencadenar complicaciones hemorrágicas o tromboemólicas, se indica una monitorización de la terapia para la HUF en todos los pacientes y para HLMW en los pacientes de riesgo (insuficiencia renal, sobrepeso, embarazo).

En el estado actual de la técnica se conocen diferentes procedimientos para monitorizar la terapia heparínica o para determinar el nivel de heparina.

La terapia y profilaxis con heparina puede ser monitoreada, por un lado, indirectamente, controlando la coagulabilidad de la sangre mediante pruebas de coagulación clásicas, por ejemplo, el PT, APTT y el tiempo de trombina. La comparación de un tiempo de coagulación medido de una muestra de paciente heparinizada, con los valores de referencia correspondientes de plasmas

estándar, de concentraciones definidas de de heparina, también posibilitan una cuantificación del nivel de heparina de una muestra de un paciente. Ejemplos de procedimientos basados en el tiempo de coagulación para la determinación de la heparina se describen, por ejemplo, en las memorias de patente US 4 067 777 y EP 217 768 B1.

5 Una forma especial de determinación de heparina basada en el tiempo de coagulación está descrita en la memoria EP 259 463 B1. En el caso de dicho procedimiento, se determina, para una alícuota de una muestra de paciente, un tiempo de coagulación, mientras que una segunda alícuota de la muestra es tratada con heparinasa para la descomposición completa de la heparina presente en la muestra y sólo entonces se determina el tiempo de coagulación. La diferencia entre ambos tiempos
10 de coagulación es una medida para la cantidad de heparina presente en la muestra, que puede ser leída en una correspondiente curva estándar. Sin embargo, en la literatura, las pruebas de coagulación se consideran inadecuadas para la determinación de HLMW, dado que, debido a su efecto antitrombina reducido no existe una influencia lineal, dependiente de la concentración, sobre el resultado de medición (tiempo de coagulación, INR) [véase, por ejemplo, Harenberg, J. (2004) Is laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy necessary? Yes. (¿Es necesario el monitoreo en laboratorio de la terapia de heparina de bajo peso molecular? Sí.) J. Thromb. Haemost. 2; páginas 547-550].

Por otro lado, el monitoreo de una terapia o profilaxis de heparina mediante los denominados ensayos de heparina amidolíticos o cromógenos, que permiten una determinación
20 precisa y sensible de la actividad heparínica. Dicho procedimiento se basa, esencialmente, en que una muestra heparínica se incuba con FXa exógeno o trombina (FIIa), así como con un sustrato cromógeno correspondiente, de factor específico, y la inactivación de la heparina de la actividad enzimática del FXa o de la trombina se determina a partir del sustrato convertido. La cantidad del producto de disociación cromógeno liberado es inversamente proporcional a la actividad heparínica.
25 Mediante una curva de calibrado, obtenida a partir de la medición de plasmas con proporciones conocidas de heparina, se puede cuantificar correctamente la cantidad de heparina de una muestra de un paciente. El agregado adicional de antitrombina a la mezcla de reacción, o bien en forma de plasma normal o también en forma purificada, provoca, por un lado, gracias a la generación de un excedente, una compensación de diferentes concentraciones de antitrombina en diferentes muestras
30 de pacientes y, por otro lado, un incremento de la sensibilidad de las pruebas, especialmente, en los sectores de concentraciones bajas de heparina. Dichos ensayos de heparina amidolíticos se pueden adquirir en diferentes variantes en el mercado. Ejemplos de ello están descritos en las memorias EP 004 271 A2 y EP 034 320 B1. Acorde al estado actual de la técnica, dichas pruebas cromógenas anti-FXa se deben utilizar, preferentemente, para la determinación de la HLMW [véase también, por
35 ejemplo, Harenberg, J. (2004)].

Otros procedimientos están descritos en las memorias WO 03/078960 y WO 02/23190.

La cuantificación de heparina se lleva a cabo, usualmente, en unidades internacionales (units) por mililitro (IU/ml). Dado que la heparina como material de extracción biológica, están sujeta a una importante dependencia del organismo, el tejido, las condiciones de extracción entre otros, y los
40 efectos mensurables en la coagulación, sólo se pueden registrar indirectamente, una definición de efecto físico-química (unit) ha sido consideradas como no aplicable. Se definieron, por ello, estándares metrológicos correspondientes con los cuales se pueden medir y declarar preparados, pero también nuevos estándares. El sistema más difundido es el sistema apoyado por WHO de unidad internacional (IU), administrado por el National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC, UK) (Instituto
45 nacional para estándares biológicos y controles) [para un panorama general, véase, por ejemplo, Mulloy, B. et al. (2000) Characterization of unfractionated heparin: Comparison of materials from the last 50 years. (Caracterización de heparina no fraccionada: comparación de materiales de los últimos 50 años) Thromb. Haemost. 84, 1052-1056 o las publicaciones más actuales de estándares biológicos en la página web del NIBSC, www.nibsc.ac.uk].

50 Como ya se ha descrito anteriormente, las diferentes heparinas inhiben con diferente intensidad la actividad enzimática del factor Xa. Por este motivo, para la calibración de un ensayo basado en el factor Xa se debe determinar una curva de calibrado propia para cada heparina por determinar, en donde se deben utilizar las diferentes concentraciones de aquella heparina que se desea cuantificar en la muestra del paciente. Para poder llevar a cabo una determinación precisa de la
55 heparina, es necesario saber con qué preparado de heparina fue tratado el paciente, para poder cuantificar los valores medidos en la curva de calibrado correcta. La desventaja de este método es que la generación de diferentes curvas de calibrado implican costos de trabajo y de material, que siempre existe el peligro de indicaciones erróneas del preparado de heparina utilizado en el paciente,

lo cual provoca el uso de una curva de calibrado errónea para la cuantificación y, como consecuencia, una interpretación errónea de los resultados de la prueba, y que, si no se mencionan indicaciones acerca del preparado con el cual fue tratado el paciente, no es posible una determinación fiable de la heparina.

5 La presente invención tiene como objeto presentar un procedimiento para la determinación de la heparina, que haga posible prescindir de la confección de curvas de calibrado específicas de cada preparado de heparina y utilizar una curva de calibrado universal para todas las heparinas. La solución acorde a la invención consiste en la presentación de los objetos y procedimientos descritos en las reivindicaciones.

10 La presente invención comprende un procedimiento in vitro para determinar heparinas, es decir, heparina UF, heparina LMW, derivados de la heparina, heparinoides y de pentasacáridos en muestras líquidas, especialmente, en muestras de líquidos corporales, como sangre, plasma, suero u orina, en donde la actividad heparínica se determina a partir de la inactivación del factor Xa, dependiente de la heparina. Sorprendentemente, se ha comprobado que la incubación de una muestra
15 heparínica no fraccionada o fraccionada, que contiene un derivado de la heparina, un heparinoide o un pentasacárido sintético, con un componente modificado con heparina, provoca que las diferencias del efecto inhibidor del FXa de las diferentes heparinas se compensen, pero el efecto inhibidor de FXa restante siga siendo correlativo a la proporción original presente en la muestra y, de ese modo, sea posible la cuantificación en una única curva de calibrado (véase asimismo, la figura 3).

20 Por componente modificador de heparina se entiende, acorde a la presente invención, una sustancia o una mezcla de sustancias que sean capaces de disociar los oligosacáridos de la heparina y que, en el caso de la utilización en un ensayo de heparina basado en FXa, no presenten efectos desventajosos para los componentes del material de la muestra u otro de los reactivos agregados, de modo que siga siendo posible una determinación cuantitativa de la inhibición de FXa que depende de
25 la heparina, en presencia de la sustancia. La idoneidad de una sustancia para la utilización como componente modificador de la heparina en el procedimiento descrito puede, por ejemplo, ser determinada llevando a cabo un ensayo de heparina basado en FXa, en presencia, y, paralelamente, en ausencia de la sustancia por analizar. Las sustancias adecuadas pueden reconocerse porque en las muestras que contienen HUF, en presencia de la sustancia, se mide una actividad anti-FXa
30 absoluta menor que en ausencia de la sustancia, asimismo, la actividad anti-FXa restante en ausencia de la sustancia aún es correlativa con la actividad heparínica original presente en la muestra, gracias a lo cual se hace posible una cuantificación correcta de la actividad heparínica.

Como componente modificador de heparina, en el procedimiento acorde a la invención, son adecuadas las enzimas, dado que actúan de modo específico y en condiciones moderadas, casi
35 fisiológicas, gracias a lo cual se minimizan o excluyen de por sí los efectos secundarios desventajosos en el procedimiento de la prueba. Son especialmente adecuadas las enzimas del conjunto de las glucuronidasas y las heparinasas, que cuentan con la capacidad de acortar y modificar las cadenas de glicosaminoglicano. Las glucuronidasas son enzimas hidrolizadoras de heparina de diverso origen, por ejemplo, provenientes de *Escherichia coli*, hígado bovino o moluscos, que acortan las cadenas de
40 glucosaminoglicanos sin modificación química. Las heparinasas, también denominadas liasas de heparina, son enzimas específicas de la heparina que se sintetizan naturalmente por microorganismos como, por ejemplo, *B. Flavobacterium heparinum* y poseen un mecanismo de reacción eliminativo, es decir, en el caso de una reacción de disociación también modifican químicamente un grupo azúcar terminal. Para la utilización como componentes modificadores de heparina en el procedimiento acorde
45 a la invención son adecuados, sobre todo, la heparinasa I, heparinasa II y heparinasa III, que, o bien se obtiene directamente de, por ejemplo, cultivos de *F. heparinum* o también puede expresarse de modo recombinante, por ejemplo, en *Escherichia coli*. Son igualmente adecuadas las mezclas de diferentes heparinasas y/o gluconidasas como componente modificados de heparina. Los procedimientos para la obtención de heparinasas endógenas de *F. heparinum*, así como para la
50 obtención genotécnica de enzimas, están descritas en el estado actual de la técnica, por ejemplo, en las memorias US 5 714 376 y EP 670 892 B1 y en las publicaciones citadas en ellas.

Mientras que en el estado actual de la técnica las enzimas modificadoras o
desintegradoras de heparina se utilizan para neutralizar dicha heparina a través de la desintegración completa, los componentes modificadores de heparina en el presente procedimiento se utilizan de
55 modo tal que no desintegren completamente la heparina presente en una muestra, sino que la heparina presente en una muestra sólo se modifique de modo tal que siga siendo posible una cuantificación de las características activadoras de antitrombina. Para ello, se incubaba un componente modificador de heparina con la muestra, preferentemente, en una concentración de 0,05 a 5,0 U/ml,

de modo especialmente preferido, en una concentración de 0,25 a 1,25 U/ml en la mezcla, antes de agregar FXa. A su vez, 1 unit corresponde a la cantidad de enzimas necesaria para disociar de la heparina (de mucosa porcina, aprox. 109 IU/mg) a 30 °C y pH 7,0 1 μ mol de oligosacáridos insaturados por minuto.

5 En el presente procedimiento, la muestra es incubada con el componente modificador de heparina durante un periodo de tiempo definido, antes de agregar el factor Xa. Preferentemente, la muestra es incubada antes de la adición de FXa durante un periodo de 10 a 900 segundos, de modo preferido, durante 15 a 90 segundos, de modo especialmente preferido, durante 20 a 60 segundos, con un componente modificador de heparina. Son posibles tiempos de incubación más cortos o más
10 largos, en donde la duración del tiempo de incubación en primer lugar se debe determinar con la concentración del componente modificador de heparina y la temperatura de reacción seleccionada. Usualmente, para la determinación de parámetros fisiológicamente relevantes en el diagnóstico de coagulación se prefiere una temperatura de reacción de 37 °C. También pueden utilizarse temperaturas de reacción mayores, siempre que el especialista tenga en cuenta los efectos
15 termodinámicos conocidos, por ejemplo, en la cinética de las reacciones bioquímicas.

En un modo de realización preferido del procedimiento acorde a la invención, primero se mezcla una muestra de plasma de citrato con un reactivo que contiene antitrombina. A su vez, se puede tratar de plasma normal, o también de antitrombina purificada. Preferentemente, la antitrombina se agrega en excedente, de modo que en la mezcla se encuentre más antitrombina que la necesaria
20 para la inhibición de FXa. En el caso en que la muestra se trate previamente con un reactivo de antitrombina, el reactivo modificador de heparina se puede hallar, preferentemente, en dicho reactivo.

Tras la incubación de la muestra con el componente modificador de heparina y, eventualmente, con antitrombina, se agrega el factor Xa a la mezcla de reacción. Se puede tratar, en este caso, de una variante humana, bovina o recombinada del factor Xa. En un modo de ejecución especialmente preferido, el reactivo de FXa puede contener, adicionalmente, sulfato de dextrano. Es igualmente posible que el sulfato de dextrano sea agregado a la muestra independientemente del reactivo de FXa.
25

Tras una fase de incubación, durante la cual se inactiva el factor Xa, dependiendo de la heparina presente en la muestra, o el derivado de heparina modificado acorde a dicha invención, se agrega un sustrato a la mezcla de reacción. Preferentemente, se utilizan sustratos cromógenos que disocian un colorante bajo efecto del factor Xa. A su vez, se puede tratar de un colorante que se determina en la sección visible del espectro, de un colorante fluorescente o de un colorante que se puede determinar en el sector UV. Preferentemente, se utilizan péptidos que en el grupo carboxilo de un radical arginina presentan un radical de un colorante enlazado por enlace amida. Son
30 especialmente adecuados para ello los grupos p-nitroanilida (pNA) y derivados de ácido 5-amino-2-nitro-benzoico (ANBA), así como los colorantes derivados de ellos por sustitución, que pueden ser cuantificados tras la disociación de la proporción de péptidos a través de una medición fotométrica a una longitud de onda de 405 nm. Ejemplos de sustratos adecuados son Bz-Ile-Glu-Gly- Arg-pNA y Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metilamida.
35

El procedimiento puede ser evaluado cinéticamente o como determinación de punto final. En el método cinético se cuantifica la reacción, es decir, la actividad del factor Xa restante, como medida de la actividad heparínica presente, a partir de la tasa de conversión del sustrato cromógeno. En el caso de la determinación del punto final, tras un tiempo de medición determinado previamente se detiene la reacción agregando un ácido, por ejemplo, ácido acético, y se mide la cantidad de
40 colorante liberado.
45

En un modo de realización preferido del procedimiento acorde a la invención, la actividad heparínica de una muestra se cuantifica independientemente del tipo de heparina que contiene la muestra, a partir de una curva de calibrado universal, adecuada para todas las variantes de heparina. La evaluación se lleva a cabo a partir de una curva de referencia, establecida mediante una solución de calibración que contiene una cantidad definida de heparina, y/o mediante disoluciones de dicha solución de calibración. A diferencia del procedimiento conocido en el estado actual de la técnica, para el procedimiento acorde a la invención no es necesario utilizar para la calibración el mismo preparado de heparina que el que debe ser determinado en una muestra de un paciente. El procedimiento acorde a la invención permite utilizar para la calibración en la cualquier heparina, no fraccionada o
50 fraccionada, o un pentasacárido, y cuantificar en la curva de calibrado establecida la actividad heparínica de cada muestra de paciente independientemente de qué preparado se suministró. Por
55

ejemplo, pueden utilizarse Liquemin® (Roche, Basilea, Suiza), una heparina no fraccionada, de alto peso molecular de mucosa porcina, o Fragmin® (Pharmacia, Kalamazoo, EE.UU.), una heparina fraccionada, de bajo peso molecular, para la determinación de una curva de calibrado universal, adecuada para todas las variantes de heparina. Preferentemente, se diluye una heparina UF o una
 5 heparina LMW con solución isotónica de sal común en 10 IU/ml y, finalmente, con un plasma pool o estándar libre de heparina, de modo que con el procedimiento acorde a la invención se pueda determinar una curva de referencia para todo el sector terapéutico.

El procedimiento acorde a la invención es adecuado tanto para la realización manual como así también para la utilización en equipos automáticos de análisis.

10 El procedimiento acorde a la invención sólo cuenta con una limitada adecuación para la determinación de la actividad heparínica en una muestra, que, adicionalmente, contiene una sustancia que inhibe el componente modificador de heparina utilizado durante la realización del procedimiento. El documento de patente WO 01/46385 A1 describe, por ejemplo, los compuestos CRM646-A y
 15 CRM646-B, que actúan como inhibidores de heparinasa y que parecen adecuados para una aplicación terapéutica. En el caso de la determinación acorde a la invención de la actividad heparínica en una muestra que presenta una sustancia que inhibe el componente modificador de heparina, se puede reducir el efecto modificador de heparina. Una cuantificación de la proporción de heparina en una muestra de ese tipo en una curva de calibrado establecida mediante el procedimiento acorde a la invención seguramente arrojaría como resultado determinaciones erróneas. Por ello, el procedimiento
 20 acorde a la invención cuenta con una adecuación para la determinación de la actividad heparínica en una muestra líquida, libre de sustancias que inhiben el componente modificador de heparina utilizado durante la realización del procedimiento. En modos de ejecución preferidos, la muestra es libre de inhibidores de glucuronidasa y/o de inhibidores de heparina, por ejemplo, CRM646-A y CRM646-B (WO01/46385 A1). Las muestras que en el sentido de la presente invención están libres de inhibidores
 25 de heparinasa y/o glucuronidasa, son, por ejemplo, muestras de líquidos corporales provenientes de uno o múltiples seres humanos o animales, que no fueron tratados terapéuticamente in vivo con un inhibidor de ese tipo, ni mezclados in vitro con dicho inhibidor.

Otro aspecto de la presente invención comprende un kit de prueba para la realización de la mezcla de heparina basada en FXa, asimismo, el kit de prueba contiene, al menos, dos reactivos, uno
 30 de los cuales contiene un componente modificador de heparina, como se define en la reivindicación 11, y el otro, FXa. Adicionalmente, los reactivos pueden contener conservantes y ser presentados como reactivos líquidos o sustancias liofilizadas.

El reactivo que presenta el componente modificador de heparina, puede contar, adicionalmente, con otro componente necesario para la realización de un ensayo de heparina basado
 35 en FXa, por ejemplo, la antitrombina o un sustrato. Según el diseño de la prueba se puede diferenciar el orden de la adición de los componentes individuales a la muestra. En algunos casos, la reacción de demostración se inicia agregando el sustrato, en otros casos, agregando FXa. Se debe tener en cuenta que el componente modificador de heparina se encuentra en un reactivo que es mezclado con la muestra antes de la adición del FXa. En un modo de ejecución especialmente preferido de un kit de
 40 prueba acorde a la invención se encuentra un reactivo que contiene el componente modificador de heparina junto con la antitrombina.

Además del reactivo que presenta el componente modificador de heparina, y el reactivo que contiene FXa, el kit de prueba acorde a la invención puede presentar, además, otros reactivos, por ejemplo, un reactivo que contenga un sustrato de factor Xa, y/o un reactivo que contiene
 45 antitrombina. Un reactivo preferido de FXa puede contener, adicionalmente, sulfato de dextrano. Otro reactivo preferido de FXa puede contener antitrombina junto con sulfato de dextrano.

Los reactivos del kit de prueba acorde a la invención pueden ser presentados en forma líquida o liofilizada. En el caso en que algunos o todos los reactivos del kit de prueba se encuentren en estado liofilizado, dicho kit puede contener, adicionalmente los disolventes necesarios para los
 50 liofilizados, por ejemplo, agua destilada, tampones adecuados y/o plasma humano estándar.

Los siguientes ejemplos de ejecución sirven para detallar el procedimiento acorde a la invención y no se deben entender como limitación del mismo.

Ejemplos

Ejemplo 1

El citoplasma humano liofilizado y reconstituido se mezcló con Liquemin® (Roche, Basilea, Suiza), una heparina UF o con Fragmin® (Pharmacia, Kalamazoo, EE.UU.), una heparina LMW, hasta alcanzar 1 IU/ml. Se incubaron, respectivamente, 20 µl de plasma con 20 µl de reactivo de antitrombina (reactivo AT; liofilizado y reconstituido, 1 IU/ml), mezclado con 0,55 U/ml (figura 1A) o 1,4 U/ml (figura 1 B) de heparinasa I (Dade® Hepzyme®, Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania), durante 20 a 900 segundos a 37 °C. Luego la mezcla de reacción se mezcló con 170 µl de reactivo de factor Xa [FXa humano liofilizado y reconstituido, con adición de TRIS (6 g/l), EDTA (0,74 g/l) y cloruro de sodio (12 g/l)] y se incubó durante 1 minuto a 37 °C. Con la adición de 40 µl de reactivo de sustrato (Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metilamida, 4 mM) se inició la reacción y se registró la formación de ANBA a una longitud de onda de 405 nm y 37 °C, en un dispositivo de medición automático, el Sysmex® CA-1500 (Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania). La modificación de extinción por minuto ($\Delta OD/min$) para los diferentes tiempos de incubación de plasma con reactivo de heparinasa AT se representó en la figura 1.

La figura 1 muestra el desarrollo de las señales de medición ($\Delta OD/min$) en el tiempo de incubación, para dos actividades heparínicas diferentes en la mezcla para plasmas con HUF (Liquemin®) o HLMW (Fragmin®). Como control, se midió en cada caso un plasma humano estándar (SHP) libre de heparina. Dicho plasma sin heparina no muestra modificaciones de extinción dependiendo del tiempo de incubación de la muestra con reactivo de heparina AT. En el caso de los plasmas que presentan heparina, al aumentar el tiempo de incubación se incrementa la modificación de extinción. Tras aproximadamente 300 segundos, la modificación de extinción alcanza una meseta que se encuentra claramente por debajo de aquella del plasma libre de heparina. También una incubación prolongada de la muestra con heparinasa, hasta alcanzar 900 segundos, no puede eliminar completamente la actividad anti-FXa de la heparina analizada. Las proporciones de heparina utilizadas sólo modulan de manera reducida la altura absoluta de la meseta alcanzada, véase la figura 1A (0,275 U/ml de heparinasa en la mezcla antes de agregar FXa) y la figura 1B (0,7 U/ml de heparinasa en la mezcla antes de agregar FXa).

Ejemplo 2

El citoplasma humano liofilizado y reconstituido se mezcló con Liquemin® (figura 2A), o con Fragmin® (figura 2B), hasta alcanzar, respectivamente, 0,24; 0,48; 0,72; 1 y 1,2 IU/ml. El reactivo AT (liofilizado y reconstituido, 1 IU/ml) se mezcló con concentraciones crecientes de heparinasa I (Dade® Hepzyme®) de 0 a 5,5 U/ml. 20 µl de plasma se mezclaron, respectivamente, con 20 µl de reactivo de heparinasa AT y se incubaron durante 20 segundos a 37 °C. Luego se mezclaron las mezclas de reacción con 170 µl de reactivo de factor Xa (véase ejemplo 1) y se incubaron durante 1 minuto a 37 °C. A través de la adición de 40 µl de reactivos de sustrato (véase ejemplo 1) se iniciaron las reacciones y se detectó automáticamente la formación de ANBA, como ya se describió en el ejemplo 1. La modificación de extinción por minuto ($\Delta OD/min$) para las diferentes mezclas de reacción de plasma con reactivo de heparinasa AT se representa en la figura 2. De esta manera se simuló una curva de calibrado con diferentes actividades heparínicas.

En la figura 2 se representa el desarrollo de las señales de medición ($\Delta OD/min$) para diferentes concentraciones de heparina en citoplasma. Las diferentes curvas indican las diferentes actividades heparínicas en la mezcla antes de agregar el FXa. En la figura 2A se agregaron plasmas con HUF (Liquemin®), en la figura 2B, con HLMW (Fragmin®). Las ilustraciones muestran que las curvas de calibrado se hacen más planas tanto para las HUF como así también para las HLMW, a medida que aumenta la proporción de heparinasa, por otro lado, con las mismas proporciones o actividad heparínica de Liquemin® o Fragmin® se hace mayor la velocidad de desintegración de heparina UF (Liquemin®) que de heparina LMW (Fragmin®). También en el caso de la mayor concentración de heparina representada en el ejemplo, se obtiene un desarrollo lineal y monótono de la recta de calibración, dependiendo de la concentración inicial de la heparina. La actividad anti-FXa de la heparina tampoco se elimina completamente con la mayor actividad heparínica seleccionada en el ejemplo en el caso de una duración de incubación de heparinasa de 20 segundos a 37 °C.

Ejemplo 3

En este caso, se seleccionó una conformación de prueba a modo de ejemplo, para demostrar el potencial de una modificación uniforme de HUF y HLMW, así como la posibilidad de una curva de calibrado común. El citoplasma humano liofilizado y reconstituido se mezcló con Liquemin® o

5 Fragmin®, hasta alcanzar, respectivamente, 0,24; 0,48; 0,72; 1,00 y 1,20 IU/ml. El reactivo AT (lío-filizado y reconstituido, 1 IU/ml) se mezcló con heparinasa I (Dade® Hepzyme®) (1,4 U/ml), como control se utilizó el reactivo AT sin adición de heparina. 20 µl de plasma se mezclaron, respectivamente, con 20 µl de reactivo AT y se incubaron durante 20 segundos a 37 °C. Luego se mezclaron las mezclas de reacción con 170 µl de reactivo de factor Xa (véase ejemplo 1) y se incubaron durante 1 minuto a 37 °C. A través de la adición de 40 µl de reactivos de sustrato (véase ejemplo 1) se iniciaron las reacciones y se detectó automáticamente la formación de ANBA, como ya se describió en el ejemplo 1. La modificación de extinción por minuto ($\Delta OD/min$) para las diferentes mezclas de reacción de plasma con reactivo de heparinasa AT se representa en la figura 3.

10 En la figura 3 se representa el desarrollo de las señales de medición ($\Delta OD/min$) para diferentes concentraciones de heparina en citoplasma. Las curvas describen, respectivamente, una combinación de heparina (HUF o HLMW) y una actividad heparínica seleccionada (0 U/ml como prueba básica, acorde al estado actual de la técnica, y 0,7 U/ml, acorde a la invención descrita en la presente). La figura 3 muestra la divergencia de las curvas de calibrado de HUF y HLMW sin adición
15 de heparina en los ejemplos Lique-min® y Fragmin® (símbolos llenos). La realización de las calibraciones con reactivo AT con heparinasa, provoca que las curvas de calibrado de las diferentes heparinas se junten en su desarrollo (símbolos abiertos). Inclusive en el caso de que el incremento de las curvas de calibrado en el ejemplo mostrado se reducen por la utilización de componentes modificadores de heparina, sigue existiendo una relación lineal clara entre las señales de medición y la
20 concentración de heparina en el plasma, que permite la correcta determinación de la concentración de heparina de las muestras de plasma a partir de dichas curvas de calibración.

Gracias a su conocimiento técnico, el especialista es capaz de modificar el incremento de la curva de calibrado y de adecuarla a los requisitos de la prueba, mediante modificaciones rutinarias en el procesamiento de la prueba (por ejemplo, modificando el volumen de la muestra, del tiempo de inactivación del FXa, de la temperatura de reacción, del valor del pH, de la intensidad de iones u otros
25 parámetros).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para determinar la actividad heparínica en una muestra líquida, en donde se cuantifica la inactivación del factor Xa agregado, que depende de la heparina, **caracterizado porque** antes de agregar el factor Xa, la muestra se incuba con una enzima del conjunto de las heparinasas o con una enzima del conjunto de las glucuronidasas o con una mezcla de diferentes enzimas de uno de los conjuntos, o con una mezcla de diferentes enzimas de ambos conjuntos.
- 10 2. Procedimiento acorde a la reivindicación 1, **caracterizado porque** antes de agregar el factor Xa, la muestra es incubada con heparinasa I, heparinasa II, heparinasa III o una mezcla de ellas.
- 10 3. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** antes de agregar el factor Xa, la muestra se incuba con una enzima del conjunto de las heparinasas o con una enzima del conjunto de las glucuronidasas o con una mezcla de diferentes enzimas de uno de los conjuntos, o con una mezcla de diferentes enzimas de ambos conjuntos en una concentración de 0,05 a 5,0 U/ml, de modo especialmente preferido, en una concentración de 0,25 a 1,25 U/ml en la mezcla.
- 15 4. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** antes de agregar el factor Xa, la muestra se incuba durante 10 a 900 segundos, preferentemente, durante 15 a 90 segundos, de modo especialmente preferido, durante 20 a 60 segundos, con una enzima del conjunto de las heparinasas o con una enzima del conjunto de las glucuronidasas o con una mezcla de diferentes enzimas de uno de los conjuntos, o con una mezcla de diferentes enzimas de ambos conjuntos.
- 20 5. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado porque** la inactivación del factor Xa agregado, que depende de la heparina, se cuantifica en presencia de antitrombina agregada.
- 25 6. Procedimiento acorde a la reivindicación 5, **caracterizado porque la** antitrombina es agregada al mismo tiempo que una enzima del conjunto de las heparinasas o una enzima del conjunto de las glucuronidasas o una mezcla de diferentes enzimas de uno de los conjuntos, o una mezcla de diferentes enzimas de ambos conjuntos.
- 30 7. Procedimiento acorde a las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** a la muestra se le agrega, adicionalmente, sulfato de dextrano.
- 30 8. Procedimiento acorde a la reivindicación 7, **caracterizado porque** el sulfato de dextrano es agregado a la muestra, al mismo tiempo que el factor Xa.
- 35 9. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** se determina la actividad heparínica en una muestra de líquidos corporales, preferentemente, en sangre, plasma de sangre, suero u orina.
- 35 10. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque**, además, independientemente del tipo de heparina que contiene la muestra, la actividad heparínica en la muestra se cuantifica a partir de una curva de calibrado adecuada para todas las variantes de heparina, generada previamente utilizando cualquier heparina.
- 40 11. Kit de prueba para la realización de un procedimiento acorde a la reivindicación 1, **caracterizado porque** contiene un reactivo que presenta una enzima del conjunto de las heparinasas o una enzima del conjunto de las glucuronidasas o una mezcla de diferentes enzimas de uno de los conjuntos, o una mezcla de diferentes enzimas de ambos conjuntos, y un reactivo que contiene el factor Xa.
- 45 12. Kit de prueba acorde a la reivindicación 11, **caracterizado porque**, además, presenta un reactivo que contiene un sustrato de factor Xa.
- 45 13. Kit de prueba acorde a una de las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado porque**, además, presenta un reactivo que contiene antitrombina.

5 **14.** Kit de prueba para la realización de un procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado porque** contiene un reactivo que presenta una enzima del conjunto de las heparinasas o una enzima del conjunto de las glucuronidasas o una mezcla de diferentes enzimas de uno de los conjuntos, o una mezcla de diferentes enzimas de ambos conjuntos, y antitrombina.

15. Kit de prueba acorde a una de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado porque** el reactivo que contiene el factor Xa, presenta, adicionalmente, sulfato de dextrano.

16. Kit de prueba acorde a una de las reivindicaciones 13 a 15, **caracterizado porque** el reactivo que contiene antitrombina contiene, adicionalmente, sulfato de dextrano.

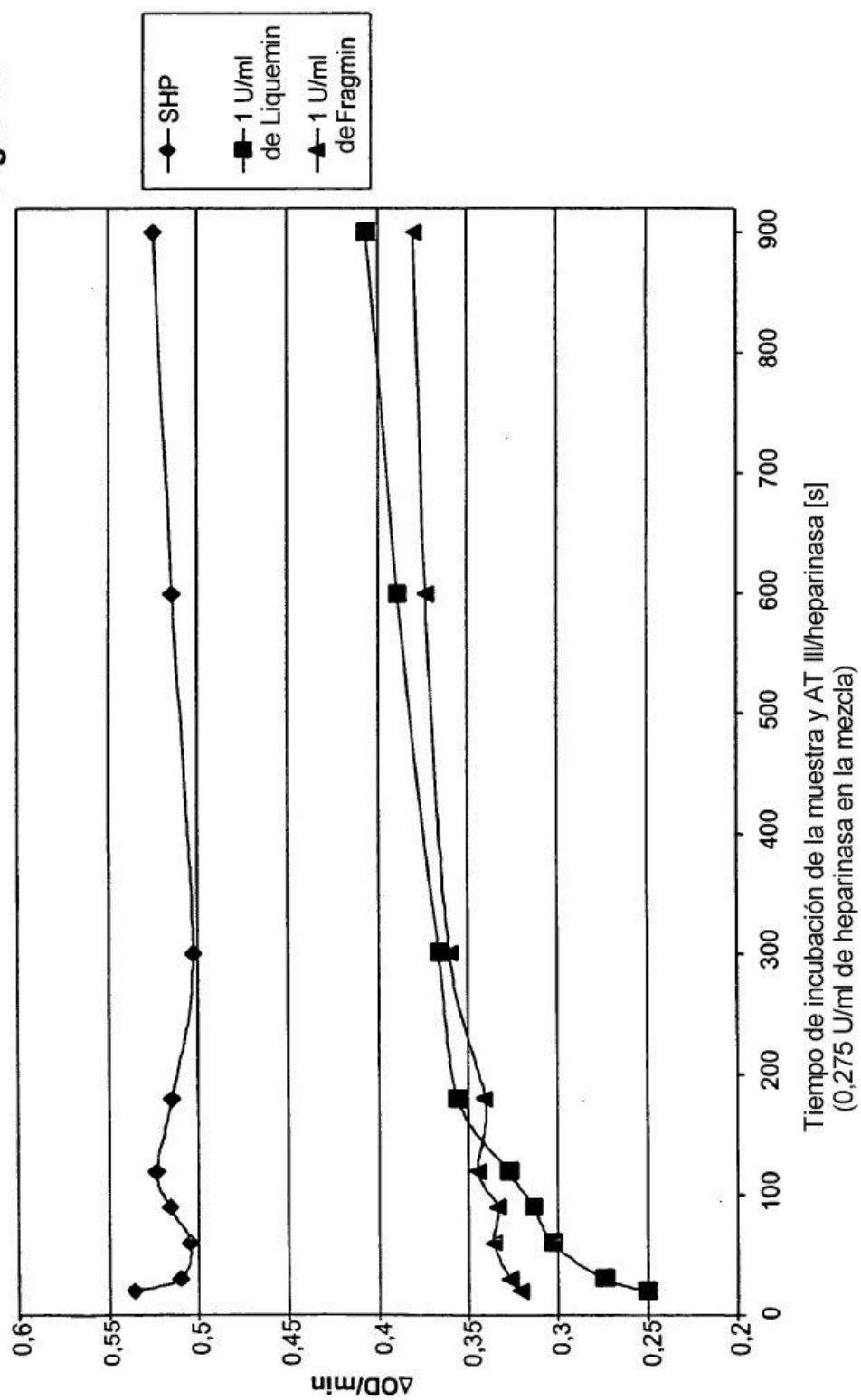
10 **17.** Kit acorde a una de las reivindicaciones 11 a 16, **caracterizado porque** uno o múltiples de los reactivos están liofilizados.

18. Utilización de un kit de prueba acorde a una de las reivindicaciones 11 a 17 para llevar a cabo un procedimiento acorde a la reivindicación 1.

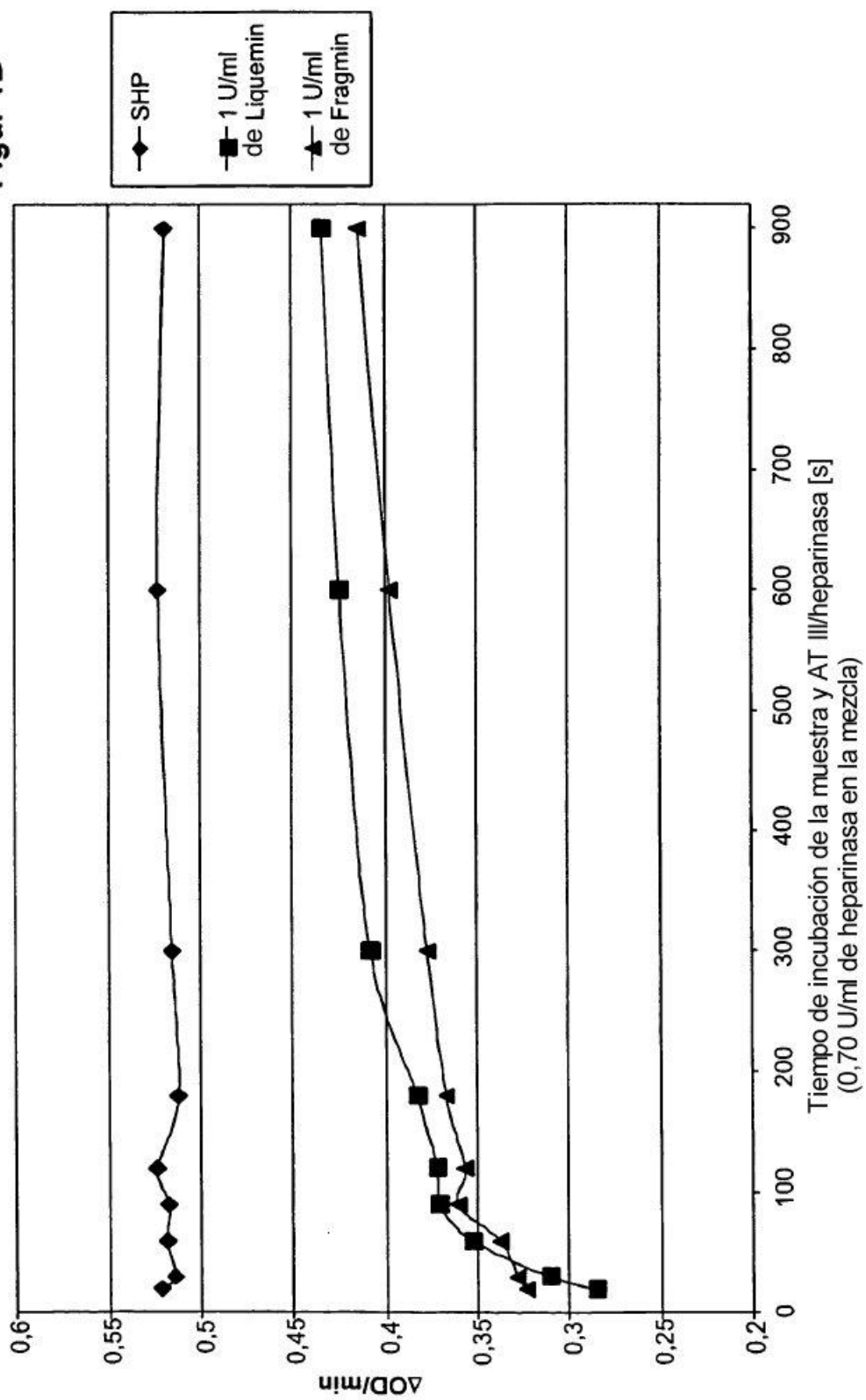
15

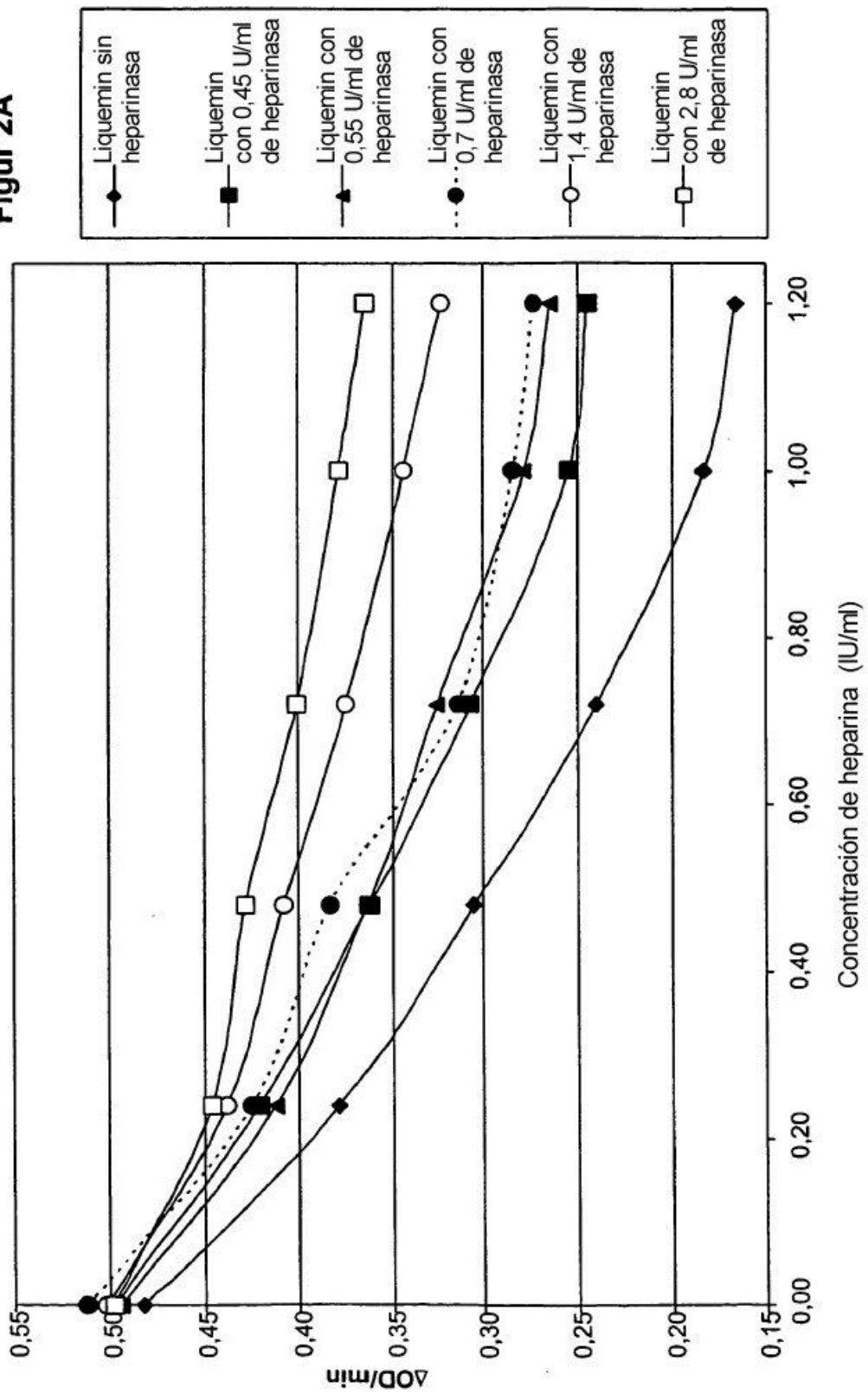
“Siguen 5 páginas de dibujos”

Figur 1A

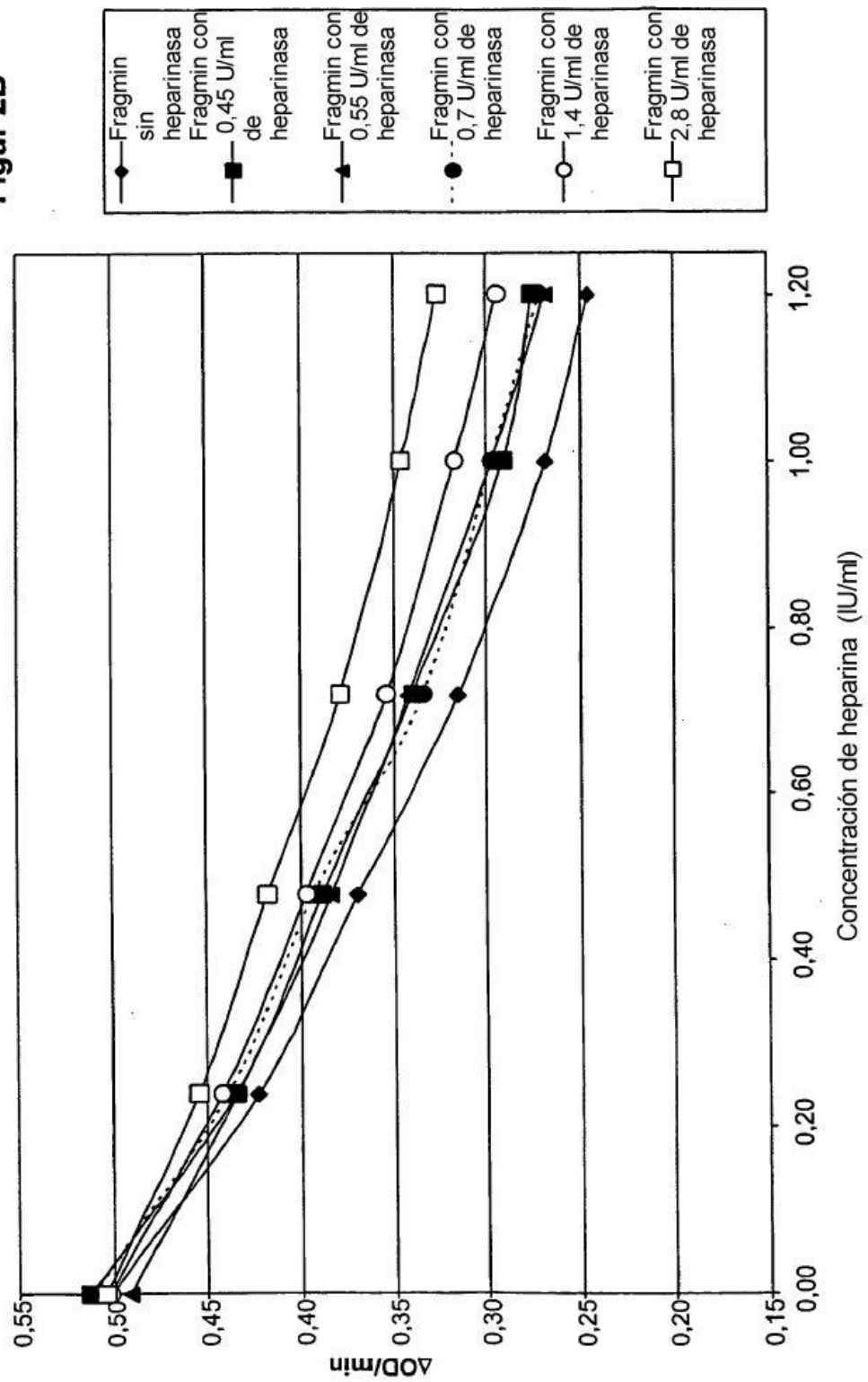


Figur 1B



Figur 2A

Figur 2B



Figur 3

