



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 086**

51 Int. Cl.:
G01N 33/86 (2006.01)
C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06753838 .9**
96 Fecha de presentación : **26.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1875249**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Determinación de la actividad de trombina en sangre completa.**

30 Prioridad: **29.04.2005 EP 05290952**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2011

73 Titular/es: **SYNAPSE B.V.**
Universiteitssingel 50
6229 ER Maastricht, NL

72 Inventor/es: **Giesen, Peter;**
Hemker, Hendrik, Coenraad;
Beguin, Suzette;
Wagenvoord, Robert;
Al-Dieri, Raed y
Nijhuis, Sabastiaan

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 354 086 T3

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

DESCRIPCIÓN

Determinación de la actividad de trombina en sangre completa.

5 La invención se refiere a un método para determinar, especialmente medir la secuencia temporal de la actividad de la trombina *in vitro*, es decir, medir la trombina activa en una muestra, especialmente cuando se desarrolla en una muestra coagulada que consiste en sangre entera. El resultado de la medida de la actividad de la trombina se puede representar por la denominada “curva de generación de trombina” ilustrada en la figura 1.

10 La invención se refiere también a medios que permiten la medida de la trombina activa después de su generación en una muestra *in vitro*. También se refiere al uso de dicho método de medida para la detección o la monitorización del estado de un paciente, incluyendo la detección o monitorización del estado patológico relacionado con la deficiencia de la coagulación de la sangre.

15 La invención trata también del uso del método de medida para el examen de sustancias, incluyendo el examen de fármacos que podrían interactuar con el procedimiento de coagulación, especialmente con la actividad de la trombina.

20 Las enfermedades trombóticas, tales como el infarto coronario, apoplejía, embolismo pulmonar y varias otras son responsables de alrededor de la mitad de todas las muertes e invalidez en la sociedad occidental. En los países en desarrollo se incrementan con el grado de desarrollo. Las enfermedades hemorrágicas, aunque numéricamente menos importantes, son también una significativa causa de muerte. De este modo el sobre- o sub-funcionamiento del sistema hemostático es un mecanismo patógeno extremadamente importante. Es por lo tanto aún más sorprendente que no esté disponible un buen análisis de funcionamiento clínico.

25 *El papel de la trombina en la enfermedad hemostática y trombótica*

30 En la hemostasia y trombosis la trombina desempeña un papel fundamental. En la enfermedad trombótica venosa esto ha sido reconocido (1) desde hace mucho tiempo y está convincentemente demostrado por el hecho de que la prevención y el tratamiento de la trombosis venosa se proporciona mejor disminuyendo la actividad de la trombina, por inhibición directa (hirudina, melagastran) o por síntesis disminuida (antagonistas de vitamina K) o por descomposición incrementada (heparinas). En el último decenio se empezó a ver cada vez más claro que la trombina es tan importante en la enfermedad arterial como lo es en la enfermedad venosa. Los ensayos clínicos han mostrado que los antagonistas (2) de la vitamina K así como la heparina (3) disminuyen la tasa de reaparición del infarto de miocardio. Un papel de la trombina en la hemorragia es sugerido por el prolongado tiempo de hemorragia que se observa cuando la generación de trombina está tan profundamente afectada como en la sobredosis severa de anticoagulantes (4) orales o heparina (5). Además, las hemofilias son enfermedades del sistema (6) de formación de trombina.

40 *Todos los elementos de la sangre participan en la formación de trombina*

La investigación moderna ha conducido al reconocimiento de que la trombina se forma por la cooperación de los elementos formados de la sangre y plasma. Los glóbulos rojos (RBCs) son los menos activos en este aspecto aunque en un pequeño porcentaje de ellos la membrana externa exhibe actividad (7) precoagulante. Mucho más importante es que los glóbulos blancos llevan la actividad del factor tisular. Esta actividad normalmente está encriptada pero en lesiones se pone de manifiesto por medio de interacciones con las plaquetas (8, 9). Los principales jugadores son indudablemente las plaquetas y el sistema de coagulación plasmática. En los libros de texto se encuentra aún que las plaquetas son responsables de la hemostasia primaria y de la trombosis arterial mientras que la coagulación del plasma sirve para la consolidación del tapón hemostático y es el mecanismo detrás de la trombosis venosa. Esta visión es debida al hecho de que el plasma y las plaquetas se estudiaron por separado. En realidad la cooperación entre las plaquetas y el plasma y las otras células de la sangre es esencial tanto en la hemostasia primaria y secundaria como en la trombosis arterial y venosa. La formación del tapón de plaquetas desempeña un papel en la generación de trombina porque los intersticios en un agregado de plaquetas forman un nicho sin agitar en el que se puede formar la trombina sin ser barrida por la sangre circulante. Es por eso por lo que medir la generación de trombina en sangre entera coagulada es tan cercano a la realidad fisiológica.

55 Aparte de formar una “esponja” en la que se puede formar trombina, las plaquetas contribuyen también activamente a la generación de trombina. Liberan factor V y proporcionan la superficie de fosfolípido procoagulante requerida para la conversión de protrombina así como para las diferentes etapas en el mecanismo de coagulación que conduce a la formación (10) de protrombinasa. La velocidad de generación de trombina y la cantidad formada depende de este modo de la actividad de las plaquetas así como de las proteínas plasmáticas implicadas. Es particularmente interesante el papel de la fibrina polimerizante. El factor de Von Willebrand (vWf) interacciona con la fibrina polimerizante y sufre un cambio conformacional que la hace reactiva al receptor de plaquetas GPIb y por medio de esta unión coopera para que las plaquetas se vuelvan procoagulantes (11, 12). Esto muestra que formar un coágulo de fibrina no es el acto final de la hemostasia y que la formación de trombina en forma de un tapón (o trombo o coágulo) es un suceso clave en el procedimiento. Ciertamente, como veremos a continuación, >95% de toda la trombina formada se forma después de que ha tenido lugar la coagulación y esta trombina es esencial en el procedimiento de hemostasia y trombosis (H&T). Quizás la mejor prueba de las estrechas uniones entre las plaquetas y el sistema de coagulación plasmática es el hecho de que todos los “inhibidores de agregación” y otros agentes antiplaqueta también inhiben la generación de trombina

en plasma rico en plaquetas (o sangre entera). Esto ha sido mostrado para aspirina (13), abciximab (14), MK383 (15) y clopidogrel (16). Inversamente, el hecho de que el fármaco antiplaquetas por excelencia, aspirina, previene la trombosis (17) venosa ilustra adicionalmente la cercana conexión entre la función de las plaquetas y la coagulación de la sangre.

5

Así, en resumen, la cantidad de trombina formada en un coágulo es una característica esencial en el procedimiento de hemostasia y trombosis y todos los elementos de la sangre participan en su formación.

Generación de trombina (TG) como indicador de riesgo trombótico y de hemorragia

10

La TG incrementada invariablemente indica riesgo trombótico, tanto si es debido a la deficiencia de antitrombina o a un exceso de protrombina. Además, en trastornos en el sistema de la proteína C (deficiencia de proteínas S y C, factor V_{Leiden}) la generación de trombina es más alta de lo normal. Esto vale para la coagulación del plasma como tal, pero se vuelve especialmente obvio si el sistema de la proteína C es activado por trombomodulina (fig. 1). La tendencia trombótica inducida por los contraceptivos orales puede ser atribuida a una resistencia adquirida a la proteína C activada que provoca un incremento del 10% de la generación de trombina que se vuelve más obvia cuando se añade TM o APC (18, 19).

15

Un caso particularmente interesante es el anticoagulante lúpico. Este tipo de anticuerpo induce un incremento del tiempo retraso de la formación de trombina, y por lo tanto un incremento del tiempo de coagulación, pero también una importante resistencia a la actividad del sistema (20) de la proteína C. Esto explica la “paradoja de LE”, es decir, un efecto anticoagulante que está acompañado de una tendencia trombótica.

20

Se ha encontrado que cantidades en exceso de los factores II, VIII y VII se correlacionan con la aparición de infarto de miocardio (21-24). Además, niveles más altos de lo normal de vWf que incrementan la generación de trombina (12) son un factor de riesgo para la trombosis arterial (25, 26).

25

En una subpoblación de jóvenes pacientes con apoplejía (alrededor de 30%) se ha mostrado que tanto la generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP) como el vWF son significativamente más altos de lo normal (27). En todas las deficiencias congénitas del factor de coagulación disminuye la generación de trombina. Esto ha sido demostrado para las hemofilias A, B y C (deficiencia de factor VIII, IX o XI; 28-31) así como para todas las deficiencias raras (protrombina, factores V, VII, X, XII; 32). Se ve una tendencia a la hemorragia tan pronto como la TG está por debajo del 20% de lo normal. En la hemofilia A no solo la infusión de factor VIII o la administración de DDAVP aumenta la capacidad de la sangre para formar trombina sino también la terapia de bypass del inhibidor con productos que contienen protrombina y/o factor VII incrementa la generación de trombina.

30

35

La trombopenia severa ($<50\ 000\ \mu\text{l}^{-1}$) provoca generación de trombina disminuida así como las trombopatías de Glanzman y Bernard-Soulier. En la enfermedad de Willebrand - que se sabe hasta ahora que induce un trastorno de adhesión de plaquetas a altas tasas de cizalladura - la generación de trombina en plasma rico en plaquetas está significativamente deteriorada (véase anteriormente). El defecto en PRP es mucho más alto que en plasma pobre en plaquetas (PPP), lo que indica que no se puede explicar por la concomitante - usualmente moderada - disminución del factor VII.

40

El trombograma

45

Se deben tener en cuenta las siguientes observaciones con respecto al mecanismo de generación de trombina cuando se trata el problema que se va a resolver según la invención.

Incluso un esquema simplificado del mecanismo de formación de trombina (fig. 1) muestra que es extremadamente complejo y está lleno de reacciones de retroalimentación positiva y negativa. Ciertamente tan complejo como para convertirse en un sistema no lineal, es decir, no hay relaciones simples entre la concentración de los reactantes y el resultado y fenómenos de umbral pueden provocar que el sistema reaccione en lo esencial imprevisiblemente. La reacción del total a un activador dado no puede por lo tanto ser deducida del conocimiento de las concentraciones individuales de los reactantes relevantes (que incluso pueden no ser conocidos) y solo un ensayo que mide la función del sistema completo como el contenido en la sangre de un paciente revela el estado hemostático/trombótico de ese paciente.

50

55

El resultado de todo el procedimiento de la generación de trombina es la aparición y desaparición de una actividad de la trombina transitoria. La curva de la actividad de la trombina frente el tiempo, o TrombogramaTM (TG) está caracterizada por una fase de iniciación, o tiempo de retraso, durante el cual solo se forman cantidades diminutas de trombina; a continuación viene un estallido de actividad, conocido como la fase de propagación (fig. 1). La sangre forma un coágulo en el comienzo del estallido y casi toda la trombina se forma después de que se ha formado el coágulo. Toda la trombina formada se inactiva subsecuentemente por las antitrombinas de la sangre. Estas proteínas se unen estequiométricamente a la trombina en una reacción lenta. La velocidad de inactivación es proporcional a la concentración de trombina y de antitrombina. Con tal de que la velocidad de conversión de protrombina sea más alta que la velocidad de inactivación de trombina el nivel de trombina aumenta. En el máximo ambas velocidades son iguales, a partir de entonces predomina la descomposición. La curva obtenida de la actividad de la trombina muestra las distintas fases y especialmente muestra el máximo de generación de trombina, el tiempo para llegar al máximo y el potencial de trombina endógena (ETP).

60

65

Técnica anterior

La necesidad de medir la función del sistema de hemostasia y trombosis no ha escapado de la atención de la profesión médica durante el último siglo. Las soluciones de este problema no han cambiado esencialmente hasta los 5 1990s, ofreciendo medios que eran prácticos pero inadecuados o adecuados pero no prácticos.

Las soluciones prácticas se refieren a la medida del tiempo de coagulación y del tiempo de hemorragia. El tiempo de coagulación mide la duración de la fase de iniciación de la generación de trombina y por lo tanto refleja solo parte de la función (33, véase también anteriormente). El único hecho de que están en uso muchas variedades del ensayo en 10 el laboratorio clínico, cada una útil solo en una situación específica, muestra ya que el tiempo de coagulación no refleja el mecanismo de coagulación en su conjunto. Para el tiempo de hemorragia se puede decir que es extremadamente impreciso teniendo un coeficiente de variación de alrededor del 40%, que simplemente limita enormemente su uso práctico (34).

Desde los 1950s se ha reconocido que medir la secuencia temporal de la trombina en la coagulación de la sangre es lo mejor para estimar la función de H&T (35-37). Hasta 1992 el único modo de medir la TG era tomando muestras de sangre coagulada o plasma y determinar la trombina contenida en ellas. Esto lleva un hombre-hora por curva y de este modo puede ser apropiado para propósitos de investigación pero no para el moderno uso clínico y epidemiológico.

En 1990 Hemker and Béguin *et al.* (EP-B1- 0 420 332) lanzaron la idea de añadir a la sangre coagulada un sustrato cromógeno (que produce color) que tenga alta especificidad por la trombina pero un bajo porcentaje de participación (baja K_{cat}) y poca afinidad de unión para trombina (alta K_m). Tal sustrato está presente durante todo el procedimiento de TG y la suma (es decir la integral) de la actividad de la trombina con el tiempo se puede medir de la cantidad total de producto formado. Idealmente esto mide el potencial de trombina endógena (ETP), es decir, el área bajo la curva de generación de trombina (AUC). 25

Posteriormente, Hemker *et al.* desarrollaron adicionalmente este método para obtener el total de la curva de TG (38). Este estaba basado en el principio de que, si las constantes cinéticas del sustrato son favorables, la velocidad de reacción puede, en buena aproximación, permanecer proporcional a la concentración de trombina durante todo el procedimiento de coagulación, de modo que la primera derivada de la concentración de producto da una curva que es proporcional a la actividad de la trombina. Este método, descrito en el documento WO 03/093831A1, era una extensión y elaboración del procedimiento descrito anteriormente en el documento EP-B2-0420332, en el que solo se mide el nivel final de producto, de cuyo modo se obtiene el área bajo la curva de la TG, es decir, el ETP.

Los sustratos usados en este método dan un producto amarillo, cuya monitorización requiere medir la densidad óptica y por tanto un medio de reacción ópticamente transparente. La turbidez provocada por la coagulación de fibrinógeno se tiene que evitar por lo tanto y el fibrinógeno tiene que ser retirado o se tiene que evitar su polimerización añadiendo inhibidores de polimerización. La retirada de fibrinógeno tiene sin embargo la desventaja de retirar un reactante importante y no se puede llevar a cabo sin retirar elementos celulares tales como las importantes plaquetas de la sangre. Además, la adición de inhibidores de polimerización, en las altas concentraciones requeridas para prevenir completamente la formación de fibrina, inhibe la enzima que convierte protrombina y las reacciones bioquímicas que conducen a su formación.

En contraste con la densidad óptica, se puede medir la fluorescencia en medios turbios. Al contrario de los sustratos cromógenos, los sustratos que dan un producto fluorescente (sustratos fluorógenos) se pueden usar por lo tanto en plasma que no está desfibrinado y por lo tanto también en plasma rico en plaquetas (PRP) (33, 39-43). El uso de un sustrato fluorógeno introduce dos desventajas importantes sin embargo: 1) la intensidad de fluorescencia no es proporcional a la concentración del fluoróforo debido al denominado efecto de filtro interno; 2) con los sustratos disponibles la velocidad de formación de producto no es necesariamente proporcional a la concentración de enzima. La última desventaja se puede superar usando sustratos que no se consumen significativamente, como en el método cromógeno. Tales sustratos no están disponibles en este momento. En la práctica real en este momento ambos problemas se resuelven conjuntamente por comparación continua de la señal experimental con la de una actividad del tipo trombina constante que actúa en condiciones exactamente idénticas a las de la muestra medida (WO 03/093831 A1). 55

El método cromógeno obviamente no se puede usar con sangre entera porque la sangre no es traslúcida. Se ha publicado que los sustratos fluorógenos son aplicables para medir la TG en sangre entera (44). En la práctica real este método publicado la mayoría de las veces da señales erráticas que no se parecen a la secuencia de generación de trombina tal como se conoce del método (fig. 2) de submuestreo establecido. También la relación cuantitativa entre la señal obtenida y la cantidad de trombina presente varía de experimento a experimento. En pocas palabras, el método descrito no da resultados reproducibles y cuantificables. 60

Otra posibilidad es la fuerte dilución de la sangre (10 veces o más), de modo que los glóbulos rojos RBC tengan menos influencia (45). Esto da curvas que son ciertamente mejores que aquellas que son obtenidas con sangre mínimamente diluida. Sin embargo no se puede pensar que este enfoque representa la situación fisiológica por dos razones. En primer lugar, después de formar un coágulo (es decir, durante la fase más importante de la generación de trombina), las reacciones que forman trombina están limitadas por difusión porque tienen lugar en interfases insolubles (superficie de plaquetas y otras células inmovilizadas en la red de fibrina). Esto las hace más sensibles a la dilución que las 65

reacciones en disolución libre tales como las reacciones de inactivación de trombina. En sangre diluida el equilibrio entre las reacciones de formación de trombina y de inactivación de trombina no es representativo de la situación que existe *in vivo*. Esto es incluso más importante en el caso de que estén contenidos en la sangre inhibidores patológicos (por ejemplo, inhibidor en hemofilia refractaria a terapia o en lupus eritematoso). Es bien conocido, en la práctica clínica que los inhibidores de coagulación pierden su efecto al diluirlos *in vitro*.

Por consiguiente queda el problema de cómo obtener una señal de la que se pueda determinar la cambiante concentración de trombina en una muestra de sangre coagulada que está diluida menos de diez veces. La presente invención pretende proporcionar una solución a este problema que supere por lo menos algunos de los inconvenientes planteados en la técnica anterior.

Se encontró por los inventores que los resultados erráticos e irreproducibles obtenidos antes de la presente invención, eran por lo menos debidos a dos causas; a: sedimentación antes de los coágulos de sangre y b: retracción del coágulo después de que ha tenido lugar la coagulación (véase fig. 4). Se deduce de ello que el volumen del que se obtiene fluorescencia cambia durante la reacción y que la forma geométrica de la superficie cambia, provocando la focalización y reflexión errática de la luz que perturba la señal recuperada. Inesperadamente fue encontrado por los inventores que estos fenómenos no ocurren cuando se opera sobre una capa delgada de sangre y especialmente en una capa delgada provista de una malla y/o microbolas. La forma geométrica de una capa delgada, con o sin dicha malla y/o microbolas, ciertamente previene la sedimentación y retracción. El volumen de reacción sin embargo permanece desconocido, por consiguiente tiene que ser determinado durante la medida. Esto se realiza añadiendo, al comienzo del experimento, una concentración conocida de una molécula fluorescente. La señal es pequeña y de este modo la relación señal/ruido se incrementa ventajosamente midiendo en una gran área superficial con cualquier dispositivo apropiado conocido en la técnica. Además, como las grandes relaciones de superficie a volumen tienden a la evaporación, se deben tomar ventajosamente medidas apropiadas para medir esto.

El documento WO 93/22453 describe un artículo de ensayo para determinar la capacidad de coagulación en una muestra de sangre.

Wielders *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 24, 1138-1142 (2004); Vanschoonbeek *et al.*, *J. Thrombosis Haemostasis* 2, 476-484 (2004); Dargaud *et al.*, *Thrombosis Res.* 116, 483-498 (2005); Tanaka *et al.*, *Anesthesiology* 99, A158 (2003); Dargaud *et al.*, *Thromb Haemost* 93, 475-480 (2005) and Furugohri *et al.*, *Eur. J. Pharmacology* 514, 35-42 (2005) describen ensayos fluorógenos de generación de trombina.

Según la invención, se describe un método que es un método para determinar *in vitro* la secuencia de la actividad de la trombina en el tiempo en una muestra en la que la muestra es una muestra de sangre y se mide la generación de trombina por las etapas de:

- poner en contacto una capa de dicha muestra con un sustrato fluorógeno de trombina, y con una concentración conocida de fluoróforo en el que dicho fluoróforo está en el intervalo de la cantidad de molécula fluorescente unida al sustrato fluorógeno de trombina y en el que dicha capa tiene un grosor dentro de un intervalo de 0,05 a 5 mm y una superficie dentro de un intervalo de 10 a 500 mm² y en el que dicha muestra se introduce en un recipiente que contiene medios que ayudan a la dispersión de la muestra;
- dejar que la trombina se genere en dicha muestra;
- medir la fluorescencia emitida de la superficie de la capa, por el grupo fluorescente desprendido del sustrato fluorógeno como resultado de la acción enzimática de la trombina generada sobre dicho sustrato fluorógeno.

El método de determinar la actividad de la trombina permite la medida de la secuencia temporal de la concentración de trombina tal como resulta de su formación y subsecuente inactivación, según el esquema de coagulación.

El método de la invención se puede llevar a cabo en muestras de sangre tales como muestras de sangre entera o muestras de plasma rico en plaquetas (PRP).

Se deja generar la trombina en la muestra usualmente después del contacto de dicha muestra con componentes apropiados para la iniciación de la generación de trombina. Tales componentes pueden comprender factores de coagulación tales como el factor tisular, y posiblemente iones calcio.

Mientras la trombina es generada y está presente en la mezcla de reacción (trombina activa), reacciona con su sustrato fluorógeno, con el resultado de que se desprende el grupo fluorescente del sustrato.

La reacción está diseñada de un modo tal que el sustrato fluorógeno está presente durante toda la duración de la reacción, en cantidades suficientemente altas para permitir medir la actividad de la trombina. Por ejemplo, la concentración de sustrato está alrededor o por encima de la Km del sustrato para trombina, de modo que el consumo del sustrato no tiene mucha influencia en la velocidad de reacción. El sustrato es convertido por trombina, conduciendo a un incremento de la fluorescencia emitida desde el sustrato de la muestra analizada.

ES 2 354 086 T3

El método definido en la invención, permite que tenga lugar la generación de trombina en una muestra de sangre, especialmente en una muestra de sangre entera, de un modo que es esencialmente comparable a la generación de trombina que ocurre en el cuerpo. Por lo tanto proporciona un método fiable de medida para aplicación en estudios de hemostasia y trombóticos.

La etapa de medir el incremento de la fluorescencia emitida desde la superficie de la capa de la muestra analizada, como resultado del desprendimiento del grupo fluorescente del sustrato por la acción de la trombina, se lleva a cabo especialmente usando un dispositivo óptico que permite tanto iluminar superficies grandes, tales como las superficies que tienen de 10 a 500 mm² como recoger la luz emitida de esa superficie. La longitud de onda seleccionada para la medida de la fluorescencia está determinada por el grupo fluorescente seleccionado. Se determina una longitud de onda para la luz de excitación que se suministra a la muestra para seguir adelante con la medida. Se determina otra longitud de onda para la luz emitida que es el resultado del desprendimiento del grupo fluorescente del sustrato fluorógeno de trombina. Es apropiado para medir la fluorescencia un dispositivo óptico, tal como un lector de placas fluorescentes conocido por expertos en la técnica (por ejemplo, el lector de placas Ascent Fluorescent, Thermolabsystems).

Según una realización de la invención, la muestra que se va a analizar, especialmente la muestra de sangre entera, se introduce en uno o más recipientes que permiten ventajosamente que se analicen varias muestras al mismo tiempo. Tales recipientes están diseñados para permitir que la muestra se introduzca según las condiciones definidas de grosor y superficie de la capa de la muestra que se va a analizar. Por ejemplo, se pueden usar microplacas de fondo plano que contienen pocillos o un recipiente o soporte que tiene otro diseño geométrico apropiado, conocidos por el experto en el campo de dichos análisis.

Se pueden usar otros dispositivos como soporte para las muestras si cumplen el requisito de permitir que dichas muestras se proporcionen para el análisis en forma de una capa que cumple con las definiciones de la invención. Por lo tanto, la descripción del método y medios de llevar a cabo la invención, que se hace con referencia a pocillos (de microplacas) que contienen las muestras puede valer para otros dispositivos (recipiente o soporte) que contienen las muestras.

Según el método de la invención, la concentración de trombina durante el ensayo es una función de la fluorescencia medida del grupo fluorescente desprendido del sustrato de trombina fluorógena. Es especialmente proporcional a la tasa de incremento de la aparición de fluorescencia.

Por consiguiente, el método de la invención permite la medida de la concentración de trombina durante todo el tiempo de actividad de la trombina en la muestra, con tal de que el sustrato fluorógeno esté presente en cantidades apropiadas.

Por lo tanto, la secuencia de la actividad de la trombina, antes y después de la coagulación de la sangre, hasta el máximo de trombina y también durante la disminución de la concentración de trombina después de que se ha obtenido el máximo de trombina como resultado de la inactivación de trombina, está representado por una medida de la curva de concentración de trombina dependiente del tiempo. Durante las distintas etapas de la actividad de la trombina, el sustrato fluorógeno reacciona con la trombina que está presente y se hidroliza especialmente, dando como resultado el desprendimiento del grupo fluorescente.

Una ventaja particular de la invención es que el método permite la medida de la generación de trombina en una muestra, especialmente en una muestra de sangre entera que no está diluida o que está mínimamente diluida, dentro de un intervalo de máximo de diez veces, especialmente menor o igual a 4 veces.

En una realización particular del método descrito, el grosor de la capa de muestra que se va a analizar, especialmente de sangre entera es de 1 a 3 mm, especialmente alrededor de 2 mm o menos.

En una realización particular del método, la superficie de la muestra, especialmente de la muestra de sangre entera, cuando se introduce en los pocillos de la microplaca o cualquier recipiente o soporte apropiado, es mayor de 20 mm², por ejemplo, de 30 mm² a 200 mm², especialmente mayor de 100 mm², en particular dentro de un intervalo de 150 a 200 mm².

Como ejemplo, la muestra se introduce en pocillos de microplacas, teniendo cada pocillo un diámetro de 15 mm y el grosor de la muestra de sangre es menor de 2 mm, permitiendo la medida sobre una superficie de alrededor de 175 mm².

La medida de la actividad de la trombina se realiza de un modo que permite múltiples puntos de lectura de la fluorescencia en la superficie de cada muestra.

Según una realización de la invención, el método se lleva a cabo con una muestra, especialmente una muestra de sangre entera que se introduce en los pocillos de una placa u otro recipiente o soporte en el que dichos pocillos también contienen una malla especialmente con un tamaño de malla de 50 μm.

Alternativamente o además de tal malla en una realización de la invención, la muestra, especialmente la muestra de sangre entera, se introduce en un pocillo o placa u otro recipiente o soporte que contiene microbolas.

ES 2 354 086 T3

La presencia de dicha malla y/o microbolas es ventajosa para ayudar a la dispersión de la sangre en el pocillo y especialmente para prevenir la retracción del coágulo en la sangre coagulada. En otras palabras, la presencia de la malla o microbolas puede prevenir alteraciones de la superficie de la sangre coagulada que hacen borrosa la señal que es medida durante la actividad de la trombina. Tal malla y/o microbolas puede mejorar la atenuación de los efectos de retracción que se obtiene usando una gran superficie para la medida. Se pueden usar también otros medios que permiten dicho efecto.

En una realización particular de la invención, los pocillos que contienen la muestra, especialmente las muestras de sangre entera se cubren para evitar el secado de la sangre durante el tiempo de medida de la actividad de la trombina, como resultado de la evaporación. Tal cubierta se puede realizar con materiales usuales, tales como tipos de película plástica delgada, con tal de que no interfieran con la medida de fluorescencia.

La medida de la actividad de la trombina en la muestra de sangre se lleva a cabo desde el instante en el que se introduce la muestra dentro de los pocillos (o cualquier otro dispositivo apropiado tal como una hendidura) y se proporcionan a dicha muestra los componentes requeridos para iniciar la generación de trombina, incluyendo el factor tisular, hasta el instante en el que se ha consumido la trombina en el procedimiento de coagulación.

En una realización particular del método de la invención, la cantidad de sustrato fluorógeno de trombina añadido a la muestra está dentro de un intervalo de 50-1000 μM . Según el método descrito, para ser capaces de conocer la concentración de trombina activa en términos absolutos (es decir, en nM/L), es necesario conocer el volumen de la muestra de sangre dentro del que se lleva a cabo la medida de fluorescencia. Para este fin se puede añadir una concentración conocida de un fluoróforo al sustrato fluorógeno de trombina en el que las respectivas proporciones de sustrato de trombina a fluoróforo están en el intervalo de 1% a 10% de la cantidad de la molécula fluorescente unida al sustrato de trombina, especialmente en el intervalo de 1% a 5%.

En una realización particular de la invención, el fluoróforo es de la misma naturaleza que la molécula fluorescente que se desprende por la acción de trombina sobre el sustrato fluorógeno.

En otra realización este fluoróforo es una especie diferente de la molécula fluorescente del sustrato fluorescente. En este caso, la medida de la fluorescencia tiene en cuenta la presencia de esta nueva especie de fluoróforo; incluye especialmente la medida de la fluorescencia del fluoróforo.

La adición de una concentración conocida de tal fluoróforo proporciona un estándar interno en la muestra que se va a analizar y permite la evaluación del volumen de la muestra en el que se mide de hecho la fluorescencia.

Para llevar a cabo el método de determinar la generación de trombina en una muestra especialmente una muestra de sangre entera, se usa ventajosamente un sustrato sintético para trombina que consiste en un compuesto químico orgánico acoplado a la molécula fluorescente.

El sustrato fluorógeno sintético puede ser un oligopéptido que tiene la secuencia de 2 a 30 restos aminoácido acoplados con una molécula fluorescente.

Puede ser especialmente útil que el grupo fluorógeno esté unido a una lisina terminal o a un resto arginina en el sustrato porque la trombina divide preferentemente grupos unidos a estos restos aminoácido.

Según una realización particular, la molécula fluorescente usada es AMC (7-amino-4 metilcumarina) o p-nitroanilida. Los sustratos sintéticos han sido 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. Wienders, *et al.* (1995), *Thromb Res* 79 (5-6): 591-9; Wienders, S.M. Mukherjee, *et al.* (1997), *Thromb Haemost* 77(4): 629-36.

Un sustrato de trombina fluorógeno sintético particular apropiado para realizar la invención es Z-Gly-Gly-Arg-AMC (disponible de BACHEM).

En una realización particular de la invención, los pocillos (o cualquier otro dispositivo apropiado) que contienen la muestra pueden comprender adicionalmente un gel, posiblemente un gel que contiene iones calcio, estando preparado dicho gel de modo que no permita la dilución de la sangre entera de la muestra. Se pueden usar geles tales como Sefadex o geles de agarosa hasta el punto de que no se secan de tal modo que permitirían que se introdujera líquido o plasma dentro del gel.

Cuando se usa un gel, se puede introducir en los pocillos previamente o junto con la muestra de sangre entera.

Los compuestos que se pueden añadir a la muestra para permitir la generación de trombina comprenden el factor tisular e iones calcio, tales compuestos son añadidos en cantidades que permiten que comience la coagulación.

Tales cantidades pueden estar dentro del intervalo de 0,05 picomol/l a 15 nanomol/l para el factor tisular, y alrededor de 10 mM de iones Ca^{++} cuando se usa sangre citrada. La invención también cubre explícitamente el caso en el que se usa sangre nativa no anticoagulada, en tal caso no se necesita añadir iones Ca^{++} . Alternativamente, en ciertas

ES 2 354 086 T3

aplicaciones es provechoso no añadir factor tisular para investigar la coagulabilidad espontánea de la sangre. El factor tisular, cuando es necesario, se añade justo antes de comenzar la medida.

5 Los iones calcio y/o el sustrato fluorógeno se pueden añadir directamente con la muestra de sangre especialmente cuando se usa calcio y sustrato fluorógeno en una disolución. El factor tisular se puede añadir también alternativa- mente a la muestra de sangre.

Cuando se introducen en el pocillo la muestra y varios compuestos, se lleva a cabo inmediatamente la medida.

10 En una realización particular del método de la invención, la sangre entera que se analiza es sangre citrada.

El método de medida de la actividad de la trombina en la muestra de sangre entera se puede usar ventajosamente para detectar o monitorizar una enfermedad hemostática o una enfermedad trombótica o para detectar o monitorizar la posibilidad de que tal enfermedad aparezca en un paciente.

15 El método permite también la detección o monitorización de la interacción de determinada(s) sustancia(s) sobre la actividad de la trombina en una muestra de sangre entera, en el que dicha(s) sustancia(s) determinada(s) se añade(n) a la muestra que se va a analizar o se añade(n) durante la generación de trombina.

20 Las sustancias que se pueden analizar según el método de la invención son por ejemplo compuestos farmacéu- ticos u otros compuestos que tienen un efecto sobre la coagulación de la sangre, tales como factores o fármacos de coagulación o factores o fármacos anticoagulantes. Los inhibidores de la trombina se pueden analizar especialmente según el método de la invención.

25 En otro aspecto, el método de la invención se puede usar para examinar sustancias para determinar su capacidad de interacción con la actividad de la trombina.

Según la invención, el método que ha sido descrito anteriormente y que se ilustrará en los ejemplos se puede usar especialmente para la medida del potencial de trombina endógena (ETP) de la muestra de sangre entera.

30 También se puede usar para la medida del tiempo hasta el máximo para trombina o para medir el tiempo de coagulación.

También es útil medir el nivel del máximo de trombina generada durante el ensayo.

35 El método de la invención ciertamente permite la medida de la denominada curva de trombina que es la primera derivada de la fluorescencia medida resultante de la reacción entre trombina y sustrato fluorógeno.

40 En un método particular de la invención, se realiza una etapa de calibración tal como la calibración descrita en la solicitud de patente WO 03/093831

El método de la invención ha sido descrito en relación a la muestra biológica que es la muestra de sangre entera. También se podría usar para analizar una muestra que podría ser plasma, especialmente plasma rico en plaquetas (PRP) o incluso plasma pobre en plaquetas (PPP).

45 La invención se refiere también a un kit para llevar a cabo el método descrito anteriormente y en los ejemplos a continuación en el que dicho kit comprende

- un sustrato fluorógeno para trombina,
- 50 - una concentración conocida de fluoróforo como estándar interno, en el que dicho fluoróforo está en el intervalo de 1-10% de la cantidad de molécula fluorescente unida a sustrato fluorógeno de trombina,
- factor tisular e iones calcio para permitir la generación de trombina,
- 55 - medios que ayudan a la dispersión de la muestra tales como una malla o microbolas que previenen la retracción del coágulo de sangre y ayudan a la dispersión de la sangre entera,
- opcionalmente un gel que comprende posiblemente iones calcio.

60 Opcionalmente, el kit comprende también instrucciones para su uso para proporcionar una guía específica para llevar a cabo el método de la invención. Otras características de la invención y sus ventajas serán descritas en los ejemplos y en las figuras a continuación.

65 **Leyendas de las figuras**

Fig. 1: Un trombograma obtenido de un experimento de submuestreo. Las principales características son: Tiempo de retraso (=tiempo de coagulación), altura de pico y área bajo la curva (=potencial de trombina endógena, ETP).

ES 2 354 086 T3

Fig. 2: Un ejemplo de curvas de generación de trombina obtenidas en plasma pobre en plaquetas por trombinografía automática calibrada.

AVK: tratamiento anti-vitamina K; TM: trombomodulina.

Fig. 3: Un esquema simplificado de la formación de trombina: son evidentes las retroalimentaciones positiva y negativa.

Fig. 4: Representación esquemática de los efectos de sedimentación y retracción del coágulo en la señal fluorescente de sangre entera coagulada.

Leyenda

Óvalos grandes: glóbulos rojos

Círculos estrellados: moléculas fluorescentes que están excitadas

Cuadrados: moléculas fluorescentes que no están excitadas

Línea superior horizontal (c.q. curvada): superficie del fluido

Línea horizontal de fondo: fondo transparente del pocillo de medida

Etapa A: sangre fluida justo después de introducirla en el pocillo (fig.1 t=0)

Etapa B: sangre fluida justo antes de la coagulación (fig. 1 t=B)

Etapa C: sangre justo después de la coagulación (fig.1 t=C)

Etapa D: sangre después del comienzo de la retracción (fig. 1 t=D)

Fig. 5: Ocular de Huygens y condensador.

Fig. 6: Capa delgada (3 mm) de sangre en pocillos de placa de microtitulación normal. Siete experimentos idénticos.

Fig. 7: Capa delgada de sangre en pocillos de placa de microtitulación de gran superficie.

Experimentos idénticos de 32 puntos de lectura por pocillo

Fig. 8: Capa delgada de sangre en pocillo de placa de microtitulación de gran superficie con malla y cubierta. Un punto de lectura a través de dispositivo de recogida de luz (ocular de Huygens) (1) curva experimental, (2) después de la corrección para α 2M-trombina.

Fig. 9: De unidades arbitrarias para trombina.

Fig. 10 A: El diseño del cartucho de muestra muestra un posible diseño de un cartucho de medida de dos compartimentos. Una delgada pieza de material (preferentemente rígida, por ejemplo, vidrio) (denominada "vidrio") posiblemente revestida con un revestimiento biocompatible, está dividida en compartimentos con un separador apropiado. Este separador puede actuar también como electrodo para detectar la inyección de muestra por la caída de resistencia y/o el incremento de corriente eléctrica. Cada compartimento puede estar revestido con sustancias como el calibrador y/o el sustrato (o cualquier otra sustancia necesaria como inhibidores y factor tisular). Se une un segundo vidrio sobre el otro vidrio. El espacio entre los dos vidrios es 5-1000 μ m, preferentemente 50 μ m.

El cartucho puede estar revestido sobre uno o más lados por un revestimiento especular dicróico apropiado que permite la amplificación óptica. Esto permite que la luz de excitación entre en el cartucho, mientras que la luz de emisión es reflejada dentro del cartucho (véase la figura 10B) y se concentrará en un lado no revestido del cartucho.

Fig. 11: Un diseño de cartucho alternativo muestra una pieza de matriz sólida, por ejemplo, se pone entre dos vidrios un polímero poroso o celulosa. Esta matriz puede contener sustrato y/o calcio (o cualquier otra sustancia como factor tisular, inhibidores). Estas sustancias pueden estar presentes junto con un disolvente, en forma seca o liofilizada.

La Fig. 12 muestra una curva de TG medida en una capa delgada de sangre en una celda de papel de filtro, convertida en trombina nM por un calibrador de Estafilocoagulasa.

Ejemplos

I Medida de la TG en sangre entera: los fenómenos observados y las dificultades técnicas para medir la TG

5 Cuando se usa un substrato fluorógeno, la fluorescencia se puede provocar y medir solo en la medida en que la luz no es interceptada por los glóbulos rojos, es decir, en el espacio del plasma accesible a la luz de excitación, que es también el espacio desde el cual puede ser observada la luz emitida. Por simplicidad, suponemos que los glóbulos rojos son completamente impenetrables a ambos tipos de luz. Si sin embargo hasta cierto punto los RBC son penetrables, el razonamiento no necesita ser alterado fundamentalmente.

10 La sangre entera forma un coágulo al final de la fase de iniciación, es decir, al comienzo de la explosiva generación de trombina en masa. En la fig. 4 se representan cuatro etapas de la situación en las superficies inferior y superior de la sangre en el pocillo de una placa de fluorímetro en presencia de un substrato fluorógeno e iluminado desde la parte superior o alternativamente desde el fondo.

15 En la etapa A la sangre agitada acaba de depositarse y los glóbulos rojos están dispersos homogéneamente en el plasma fluido (fig. 4 A). En el transcurso del tiempo de retraso antes de la coagulación (típicamente 3-12 minutos) tiene lugar la sedimentación de los glóbulos rojos; en la parte superior más plasma se vuelve accesible a la luz y menos en el fondo (fig. 4 B). Tan pronto como se coagula la sangre (fig. 4 C) el *estatus quo* alcanzado en B se “congela” por la aparición del coágulo de fibrina. Debido a la acción de la trombina en las plaquetas de la sangre se inicia la retracción del coágulo tan pronto como se forma un coágulo. La sedimentación y la formación de coágulo son fenómenos que son visibles a simple vista en una escala de mm por hora. En el dominio micrométrico ocurren en el transcurso de minutos, es decir, en la escala de tiempo de los experimentos de TG. La retracción provoca una distribución desigual de los RBCs y también un cambio en la superficie, de tal modo que ya no es plana sino que se vuelve ondulada. Esta ondulación provoca un reparto desigual de plasma y coágulo en la superficie y causa efectos ópticos impredecibles. Las irregularidades de la superficie son en una escala de mm visibles a simple vista. Por lo tanto son del mismo orden de magnitud que el área de excitación de la luz en fluorimetría normal.

20 La sedimentación y retracción inducen un cambio del volumen de fluido en el que las moléculas fluorescentes pueden ser alcanzadas por la luz de excitación. Debido a este cambio el volumen real en el que tiene lugar la medida es variable y desconocido. Por consiguiente, es imposible la cuantificación reproducible de la cantidad de trombina a partir del porcentaje de producción de señal obtenida en estas condiciones, incluso si fueran despreciables los efectos de sedimentación y retracción.

25 Los experimentos llevados a cabo usando pocillos de placa de microtitulación ordinaria y un volumen que llenaba estos pocillos hasta la altura (6 mm) normal permitió que se obtuvieran resultados satisfactorios solo en un pequeño porcentaje de los pocillos. Esto se explica por el hecho de que en la fluorimetría ordinaria se obtiene una señal suficiente solo si el punto de superficie medida (alrededor de 4 mm²) coincide con un área en la que se puede obtener suficiente señal porque hay suficiente plasma disponible; que no está encima de una masa de coágulo retraída sino en un “valle” de la superficie (véase fig. 4 D). Las publicaciones positivas en la bibliografía de medida deben ser el resultado de una cuidadosa selección de los datos obtenidos. En aquellos casos en los que se obtiene una señal de la forma correcta, la medida cuantitativa de la trombina es imposible porque el volumen de medida es desconocido y variable. La medida desde el fondo a través de una hoja transparente resolvería el problema de las irregularidades de la superficie pero, debido a la sedimentación de RBC, la señal se vuelve tan pequeña que se ahoga en el ruido de fondo.

30 Se ha observado que, con el llenado normal de los pocillos de una placa de 96 pocillos del tipo disponible hasta ahora, es posible obtener una señal interpretable en 1 o 2 de cada 10 pocillos. Si los pocillos se llenan hasta menos de 2 mm de altura como altura normalmente útil, se obtiene señal en casi todas las medidas. Sin embargo la señal que se obtiene de esta manera en un fluorímetro normal es muy variable y pequeña, es decir, corresponde a 1-5% de la señal obtenida con plasma, y muestra una gran relación señal/ruido (fig. 6). Concluimos que no hay un modo práctico de determinar la TG en sangre entera usando el sistema óptico de un fluorímetro normal.

II El diseño del método de la invención

55 1. Principio de la invención

Inesperadamente se encontró que (a) los efectos de sedimentación y retracción disminuyen progresivamente con el grosor de la capa de sangre coagulada y, (b) que medir la fluorescencia de una superficie mayor de alrededor de 10 mm² tiende a compensar las restantes irregularidades de la superficie provocadas por la retracción. Igual e inesperadamente, los efectos de sedimentación y retracción se pueden reducir adicionalmente conteniendo la sangre en laberintos o intersticios, tales como una malla de filtro (que tiene aberturas de malla de 50-500 μm) o esferas empaquetadas (diámetro 50-500 μm). Consecuentemente, los inventores proporcionan condiciones para obtener una señal fluorescente no perturbada del producto de la actividad de la trombina permitiendo que se lleve a cabo la medida en una capa delgada de sangre (especialmente inferior a 2 mm) extendida sobre una superficie mayor de alrededor de 10 mm².

65 Para resolver el problema del volumen desconocido en el que se mide la reacción, los inventores decidieron adicionalmente no usar substrato puro sino substrato que ya contenía una concentración baja fija pero desconocida y fácilmente medible de producto fluorescente.

2. Dispositivo óptico para la medida

Medir sobre una superficie más grande de lo normal requiere dispositivos ópticos que permitan iluminar las superficies más grandes y recoger la luz emitida de esa superficie. Uno de tales dispositivos no es distinto de un ocular de Huygens, otro como un condensador de microscopio (fig. 5). Para incrementar la señal fluorescente la sangre se puede extender sobre una superficie reflectora, y tal superficie puede ser una parte integral del dispositivo descrito a continuación.

3. El dispositivo que contiene la muestra de sangre

El uso de un dispositivo que contiene la sangre en los intersticios de su estructura permite la simulación de la situación de la sangre derramada en una herida, se puede hacer que contenga factor tisular, trombomodulina y/u otros elementos que se sabe que existen en la pared de los vasos normales que afectan al proceso de TG (por ejemplo, colágeno). Para comparar, el material del que está hecho el dispositivo se puede escoger entre material inerte tal como, por ejemplo, nailon o polipropileno.

Para evitar el secado de la superficie, la capa delgada de sangre se puede cubrir con una película delgada de material sólido o fluido. Alternativamente la sangre se puede guiar a una hendidura dentro de un material traslúcido, por ejemplo, por fuerzas capilares.

4. Medida

Es una ventaja de medir en una capa delgada que la señal fluorescente es proporcional a la concentración de moléculas fluorescentes; en otras palabras, el efecto de filtro interno no desempeña un papel. Sin embargo el consumo de sustrato si que desempeña un papel. Se puede compensar de tres modos: (a) Como en el método cromógeno (38), es decir, proporcionando sustratos con constantes cinéticas de tal modo que el consumo de sustrato tiene un efecto despreciable, (b) corrigiendo el consumo de sustrato matemáticamente, es decir, aplicando la ecuación de tasa integrada y (c) usando un calibrador como se describe en la patente WO 03/093831.

La secuencia de la concentración de trombina al coagular sangre entera se determina a partir de la acción enzimática de la trombina sobre un sustrato fluorógeno añadido a la sangre. Se ha obtenido una señal estable y suficiente midiendo en una capa delgada ilustrada por una capa de menos de 2 mm de grosor en una gran superficie (ilustrada por una superficie que tiene más de 10 mm²). Para medir el volumen real en el que tiene lugar la reacción se añade una pequeña cantidad de fluoróforo al sustrato. Se requiere un dispositivo óptico especializado para iluminar toda la superficie y otro para recoger la luz emitida por la superficie.

La capa delgada se podría estabilizar y prevenir que se secase por una serie de medios mecánicos, entre los cuales se pueden usar una malla inerte o una malla de material escogido tal como para imitar ciertas propiedades de la pared del vaso. Alternativamente se puede usar una pequeña hendidura.

El sistema se puede usar también para medir la generación de trombina en plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas.

5. Mezcla de reacción

Compuestos químicos

El factor tisular relipidado recombinante (rTF) que no contiene polibreno o Ca⁺⁺ es de Dade Behring (Marburg, Alemania). El sustrato fluorógeno Z-Gly-Gly-Arg-AMC se obtiene de Bachem (Suiza). Al romperse con trombina desprende 7-amino-4-metilcumarina (AMC) fluorescente que se mide por un conjunto de filtro de excitación de 390 nm y emisión de 460 nm.

Se prepara una mezcla fresca de sustrato fluorógeno y CaCl₂ (FluCa) para cada experimento como sigue: a 875 μl de tampón (Hepes 20 mM, pH 7,35) que contiene 60 g/l de BSA (Sigma, A-7030) se añadieron 100 μl de CaCl₂ 1M. A 37°C, se echó un chorro de 25 μl de una disolución en DMSO 100mM del sustrato fluorógeno e inmediatamente se mezcló vigorosamente. La disolución transparente resultante, denominada FluCa, de este modo es 2,5 mM en sustrato fluorógeno y 100 mM en CaCl₂.

El tampón A contiene hepes 20 mM, NaCl 140 mM, 5 mg/ml de BSA, pH=7,35.

El tampón B contiene hepes 20 mM, NaCl 140 mM, 60 mg/ml de BSA, pH=7,35.

Sangre y plasma

La sangre se obtiene por punción en vena (1 volumen de citrato de trisodio 0,13 M a 9 volúmenes de sangre). Se debe emplear el flujo libre o una mínima succión; se deben evitar los recipientes a vacío.

ES 2 354 086 T3

Las medidas se llevan a cabo en un fluorímetro de placas (Ascent reader, Thermolabsystems OY, Helsinki, Finland) equipado con un conjunto de filtro 390/460 (excitación/emisión). En lugar de una placa normal de 96 pocillos, se usa una placa de pocillos con 24 pocillos redondos con un diámetro de 15 mm y por lo tanto una superficie de 175 mm². Los pocillos se preparan lavando varias veces con tampón A y secando los pocillos.

5 A continuación se añade la mezcla de sangre y sustrato en la que tiene lugar la generación de trombina. Esta mezcla contiene, por pocillo que se va a llenar: 80 μ l de sangre entera citrada,

10 20 μ l de Innovin[®] diluido 1:1000 en tampón A, 20 μ l de FluCa o, según sea el caso, un múltiplo de estos volúmenes.

10 Inmediatamente después de la adicción del FluCa, la mezcla se agita en un mezclador Vortex y se añade a los pocillos. La placa se inserta en el fluorímetro y se agita durante 10 s a 1200 rpm y a continuación se mide cada dos minutos a 390/460 nm y 37°C durante una hora.

15 A cada pocillo se añaden 120 μ l de la mezcla.

Ejemplo 1

20 *Múltiples puntos de lectura, añadiendo una malla y una cubierta*

25 La generación de trombina se desencadenó como se indicó anteriormente en tres pocillos. Se iluminaron 24 puntos por pocillo y se midieron uno tras otro. Se sumaron las señales de los 24 puntos en cada lectura. Los resultados se muestran en la fig. 7. Se ve que la señal aumenta y se estabiliza añadiendo una malla, aquí un filtro de nailon con una abertura de malla de 600 μ m, 51% de área abierta y un grosor de 445 μ m (Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez California, USA). Sin embargo, la señal se incrementa espuriamente con el tiempo debido a la evaporación y concentración de la capa superior. Esto se evita cubriendo con una lámina de plástico (Thermosprint Optical Clear Sealing Tape para QPCR (Bilatec AG, Mannheim, Germany)).

30 Ejemplo 2

Múltiples puntos de lectura, añadiendo un gel y una cubierta

35 La generación de trombina se desencadenó como se indicó anteriormente en tres pocillos. Se iluminaron 24 puntos por pocillo y se midieron uno tras otro. Se sumaron las señales de los 24 puntos en cada lectura. A dos pocillos se añaden 700 μ l de una disolución de Sphehadex-25 al 50% (v/v) en NaCl 150 mM y se deja sedimentar el polvo durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante (300-400 μ l) del pocillo con una pipeta.

40 A continuación se añaden 120 μ l de la mezcla de sangre coagulada. Encima de uno de estos dos pocillos se aplicó una lámina de plástico (Thermosprint Optical Clear Sealing Tape para QPCR (Bilatec AG, Mannheim, Germany)). Los resultados son comparables a los de la fig. 7.

45 Ejemplo 3

Recoger la luz con un dispositivo óptico

50 Para este experimento se midió un pocillo con malla y cubierta como en el ejemplo 1 con la ayuda de un fluorímetro Fluostar optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany). La luz de la muestra se recogió en un ocular de Huygens (x10 aumentos) y se leyó después de pasar a través de este dispositivo óptico. Los resultados se muestran en la fig. 8.

Ejemplo 4

55 *De unidades arbitrarias a trombina*

60 Este experimento se llevó a cabo esencialmente como el del ejemplo 1 con malla y cubierta pero se añadió una cantidad conocida (10 nM) de AMC al sustrato Z-Gly-Gly-Arg-AMC. Debido a la sedimentación de los eritrocitos, aumenta el volumen en el que tiene lugar la medida de modo que aumenta la señal de AMC presente. En el momento de la coagulación la situación se “congela” y no tiene lugar sedimentación adicional. En ese momento, conocido por un repentino aumento de señal, medimos la cantidad de fluorescencia debida a los 10 nM de AMC añadido. De este modo sabemos como convertir unidades de fluorescencia (F) en concentración de AMC. De este modo la dF/dt medida se puede convertir en d[AMC]/dt. De un experimento independiente sabemos qué d[AMC]/dt corresponde a 65 qué concentración de trombina. De este modo la velocidad de cambio de la fluorescencia (fig. 9, línea negra) se puede convertir en concentración de trombina de la muestra.

Ejemplo 5

Dispositivo que contiene la muestra de sangre

5 Se prepara una celda de papel de filtro que contiene sustrato e iones Ca^{++} añadiendo $50 \mu\text{l}$ de una disolución de DMSO 100 mM del sustrato fluorógeno y $100 \mu\text{l}$ de una disolución de CaCl_2 1M en $5850 \mu\text{l}$ de etanol. Se extienden $11 \mu\text{l}$ de esta disolución sobre un trozo de matriz sólida (papel cromatográfico Whatman 1MM) de 7×9 mm y se seca en nitrógeno. A continuación se cubre entre dos trozos de plástico (Thermosprint Optical Clear Sealing Tape para QPCR (Bilatec AG, Mannheim, Germany) como se muestra en la Figura 11.

10 Se usa el mismo procedimiento para preparar una celda de papel de filtro que solo contiene sustrato, en este caso se añaden $50 \mu\text{l}$ de una disolución de DMSO 100 mM del sustrato fluorógeno a $5950 \mu\text{l}$ de etanol, de los cuales se extienden $11 \mu\text{l}$ sobre un trozo de matriz sólida y se seca en nitrógeno.

15 *Múltiples puntos de lectura, usando una celda de papel de filtro*

Se prepararon recientemente como se describe anteriormente dos celdas de papel de filtro, una que contiene sustrato fluorógeno e iones calcio (A) y una que solo contiene sustrato (B).

20 Se preparó una mezcla 4:1:1 de sangre entera citrada, tampón B e Innovin® (diluida 1:1000 en tampón A). Como calibrador, se preparó una mezcla 4:1:1 de sangre entera citrada, inhibidor de polimerización (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH . AcOH) (Bachem feinchemikalien AG, Bubendorf, Switzerland) en tampón B (1,0 mM) y estafilocagulasa $20 \mu\text{M}$ mezclando sangre entera e inhibidor de polimerización. Justo antes de comenzar el experimento, se añadió la estafilocagulasa y se mezcló bien la muestra.

25 Inmediatamente después de añadir la estafilocagulasa, se inicia el experimento añadiendo $11 \mu\text{l}$ de la muestra de TG a la celda A y $11 \mu\text{l}$ del calibrador a la celda B. Esto se efectúa pipeteando las gotas cerca de la matriz sólida de un modo que la gota toca la matriz (véase la Figura 11) y es absorbida dentro de ella por fuerzas capilares. Por celda, se iluminan 4 puntos y se miden uno tras otro.

30 La señal del calibrador es una línea recta, la pendiente se usa para convertir la señal de la celda de la muestra en trombina nM. Esta es la calibración convencional de la señal como se conoce en la técnica y no la calibración continua en el sentido de la solicitud de patente PCT/EP 03/04705. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Referencias

35 1. **Loeliger** E A. 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 anticoagulant therapy in elderly patients after myocardial infarction. Report of the Sixty Plus Reinfarction Study Research Group. *Lancet* 1980;2:989-94.

45 3. **Engelberg** H. Heparin and atherosclerosis. A review of old and recent findings. *Am Heart J* 1980;99:359-72.

4. **Marongiu** F, **Biondi** G, **Sorano** G G, **Mameli** G, **Conti** M, **Mamusa** A M, **Cadoni** M C, **Balestrieri** A. Bleeding time is prolonged during oral anticoagulant therapy. *Thromb Res* 1990;59:905-12.

50 5. **Schulman** S, **Johnsson** H. Heparin, DDAVP and the bleeding time. *Thromb Haemost* 1991;65:242-4.

6. **Sjolin** K E. The thrombin generation test in the diagnosis of classical hemophilia and Christmas disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1956;8:138-44.

55 7. **Peyrou** V, **Lormeau** J C, **Herault** J P, **Gaich** C, **Pfiegger** A M, **Herbert** J M. Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood. *Thromb Haemost* 1999;81:400-6.

8. **Giesen** P L, **Nemerson** Y. Tissue factor on the loose. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:379-84.

60 9. **Giesen** P L, **Rauch** U, **Bohrmann** B, **Kling** D, **Roque** M, **Fallon** J T, **Badimon** J J, **Himber** J, **Riederer** M A, **Nemerson** Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2311-5.

10. **Hemker** H C. Platelet procoagulant activities: the amplification loops between platelets and the plasminiclotting system. In *Platelets, Gresele, Page and Fuster eds.* 2002; Cambridge University Press: 381-392.

65 11. **Beguín** S, **Keularts** I, **Al Dieri** R, **Bellucci** S, **Caen** J, **Hemker** H C. Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost* 2004;2:170-6.

12. **Beguin S, Kumar R, Keularts I, Seligsohn U, Coller B S, Hemker H C.** Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. *Blood* 1999;93:564-70.
13. **Kessels N, Beguin S, Andree H, Hemker H C.** Measurement of thrombin generation in whole blood--the effect of heparin and aspirin. *Thromb Haemost* 1994;72:78-83.
14. **Reverter J C, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker H C, Coller B S.** 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 I M, Beguin S, de Zwaan C, Hemker H C.** Treatment with a GPIIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients. *Thromb Haemost* 1998;80:370-1.
16. **Herault J P, Dol F, Gaich C, Bernat A, Herbert J M.** Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat. *Thromb Haemost* 1999;81:957-60.
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 R C, Roozendaal K J, Eijlsman L, Hemker H C.** The influence of oral contraceptives on the time-integral of thrombin generation (thrombin potential). *Thromb Haemost* 1993;70:959-62.
19. **Rosing J, Hemker H C, 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 O, 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.
21. **Redondo M, Watzke H H, Stucki B, Sulzer I, Biasiutti F D, Binder B R, Furlan M, Lammle B, Willemin W A.** 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.
22. **Burzotta F, Leone A M, 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.
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.
24. **French J K, Van de Water N S, Sutton T M, Lund M, Gao W, McDowell J, Liu-Stratton Y, Pohorence J, Szymanski D, Goldschmidt-Clermont P, White H D, Browett P J, Cooke G.** Potential thrombophilic mutations/polymorphisms in patients with no flow-limiting stenosis after myocardial infarction. *Am Heart J.* 2003;145:118-24.
25. **Thompson S G, Kienast J, Pyke S D, Haverkate F, van de Loo J C.** Hemostatic 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 M L, Mossard J M, Arbogast R, Najib K, Grunebaum L, Sacrez A, Cazenave J P.** [Von Willebrand factor in coronary disease]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1994;87:85-93.
27. **Faber C G, 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* 2003;33:52-8.
28. **Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholzu 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 H J, 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.
30. **Keularts I M, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker H C, 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 I M, Hamilyak K, Hemker H C, Beguin S.** The effect of DDAVP infusion on thrombin generation in platelet-rich plasma of von Willebrand type 1 and in mild haemophilia A patients. *Thromb Haemost* 2000;84:638-42.

32. Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci P M, Schved J F, Beguin S, Hemker H C. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost* 2002;88:576-82.
- 5 33. Hemker H C, Beguin S. Phenotyping the clotting system. *Thromb Haemost* 2000;84:747-51.
34. Kessels H, Kester A D, Hemker H C. Intrinsic and method-induced variation of the bleeding time and related parameters. *Thromb Haemost* 1994;71:798-9.
- 10 35. Biggs R, Mac F R. The reaction of haemophilic plasma to thromboplastin. *J Clin Pathol* 1951;4:445-59.
36. Biggs R, Douglas A S, Macfarlane R G. The formation of thromboplastin in human blood. *J Physiol* 1953;119:89-101.
- 15 37. Macfarlane R G, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol* 1953;6:3-8.
38. Hemker H C, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993;70:617-24.
- 20 39. Hemker H C, Giesen P L, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000;83:589-91.
40. Hemker H C, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-53.
- 25 41. Hemker H C, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
- 30 42. Hemker H C, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* 1995;74:134-8.
- 35 43. Hemker H C, Al Dieri R, Beguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 2004;11:170-5.
44. Ramjee M K. The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. *Anal Biochem* 2000;277:11-8.
- 40 45. Lo K, Diamond S L. Blood coagulation kinetics: high throughput method for real-time reaction monitoring. *Thromb Haemost* 2004;92:874-82.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar *in vitro* la actividad de la trombina en una muestra biológica que es una muestra de sangre entera o una muestra de plasma y en el que la generación de trombina se mide por las etapas de:
- 10 - poner en contacto una capa de dicha muestra con un sustrato fluorógeno de trombina y con una concentración conocida de fluoróforo en el que dicho fluoróforo está en el intervalo de 1-10% de la cantidad de molécula fluorescente unida al sustrato fluorógeno de trombina, y en el que dicha capa tiene un grosor dentro de un intervalo de 0,05 a 5 mm y una superficie dentro de un intervalo de 10 a 500 mm², y en el que dicha muestra se introduce en un recipiente que contiene medios que ayudan a la dispersión de la muestra;
 - 15 - permitir que se genere trombina en dicha muestra;
 - medir la fluorescencia emitida desde la superficie de la capa, por el grupo fluorescente desprendido del sustrato fluorógeno como resultado de la acción enzimática de la trombina generada sobre dicho sustrato fluorógeno.
- 20 2. Un método de la reivindicación 1, en el que la concentración de trombina generada durante el ensayo se determina como una función de la fluorescencia medida del grupo fluorescente desprendido.
- 30 3. Un método de la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra de sangre entera se diluye dentro de un intervalo de un máximo de 10 veces.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grosor de la capa de la muestra es de alrededor de 2 mm o menos.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que, para el ensayo, la muestra de sangre se introduce dentro de un pocillo de una placa que también contiene una malla con tamaño de malla de 50 a 500 μ m.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, para la muestra, la muestra de sangre se introduce en un pocillo de una placa que también contiene microbolitas.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el pocillo que contiene la muestra de sangre está cubierto para la determinación de la actividad de la trombina.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad de sustrato de trombina añadida a la muestra está dentro de un intervalo de 50 a 1000 μ M.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sustrato fluorógeno es un sustrato sintético para trombina, unido a una molécula fluorescente.
10. Un método según la reivindicación 9, en el que el sustrato de trombina es un compuesto químico orgánico, unido a una molécula fluorescente.
11. Un método según la reivindicación 10, en el que el sustrato fluorógeno es un oligopéptido que tiene una secuencia de 2 a 30 residuos aminoácido unidos a una molécula fluorescente.
12. Un método según la reivindicación 11, en el que el oligopéptido tiene una lisina o arginina terminal para unirse a una molécula fluorescente.
13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la molécula fluorescente es AMC (7-amino-4-metilcumarina).
14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el pocillo comprende adicionalmente un gel, que contiene posiblemente iones calcio, en el que dicho gel no permite la dilución de la sangre de la muestra.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el factor tisular y los iones calcio se añaden a la muestra de sangre en cantidades que permiten que ocurra la generación de trombina.
16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la muestra de sangre, es una muestra de sangre entera.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la muestra de sangre es una muestra de plasma, especialmente plasma rico en plaquetas (PRP).
18. El método según la reivindicación 16, en el que la muestra de sangre entera está citrada.

ES 2 354 086 T3

19. El uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para detectar o monitorizar una enfermedad hemostática o una enfermedad trombótica.

5 20. El uso según la reivindicación 19, para detectar o monitorizar la interacción de determinada(s) substancia(s) sobre la actividad de la trombina en una muestra de sangre entera, en el que dicha(s) substancia(s) determinada(s) se añade(n) a la muestra que se va a analizar o se añade(n) durante la generación de trombina.

21. El uso según la reivindicación 19 para monitorizar la interacción de factores de coagulación o fármacos.

10 22. El uso según la reivindicación 19 para examinar sustancias para determinar su capacidad de interacción con la generación de trombina.

15 23. El uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la medida del potencial de trombina endógena (ETP) de la muestra de sangre entera.

24. El uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para la medida del tiempo hasta el máximo de trombina.

20 25. El uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para la medida del tiempo de coagulación.

26. El uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para la medida del nivel del máximo de trombina generada.

25 27. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende una etapa de calibración.

28. Un kit para llevar a cabo un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende:

- 30 - un sustrato fluorógeno para trombina,
- una concentración conocida de fluoróforo como estándar interno, en el que dicho fluoróforo está en el intervalo de 1-10% de la cantidad de molécula fluorescente unida al sustrato fluorógeno de trombina,
- 35 - factor tisular e iones calcio para permitir la generación de trombina,
- medios que ayudan a la dispersión de la muestra tales como una malla o microbolas que previenen la retracción del coágulo de sangre y ayuda a la dispersión de la sangre entera,
- 40 - opcionalmente un gel, que comprende posiblemente iones calcio.

45

50

55

60

65

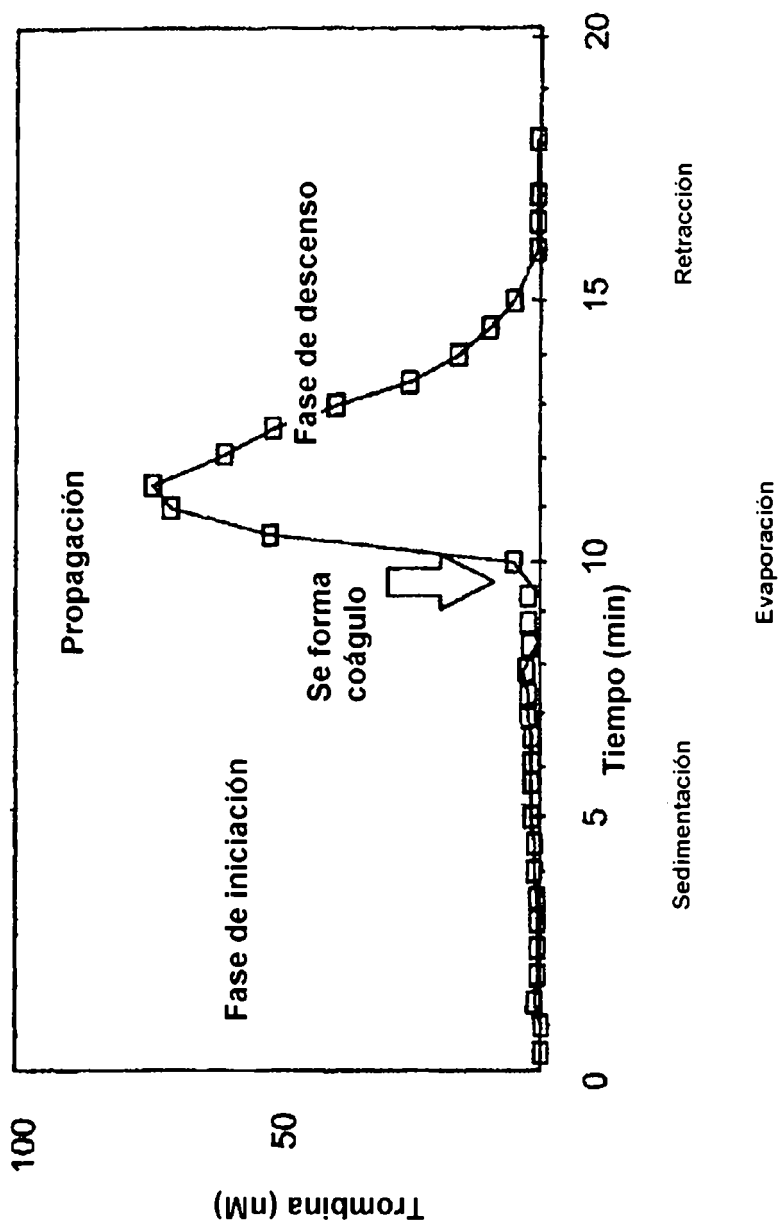


Figura 1

AVK – Ejemplo de interacciones complicadas

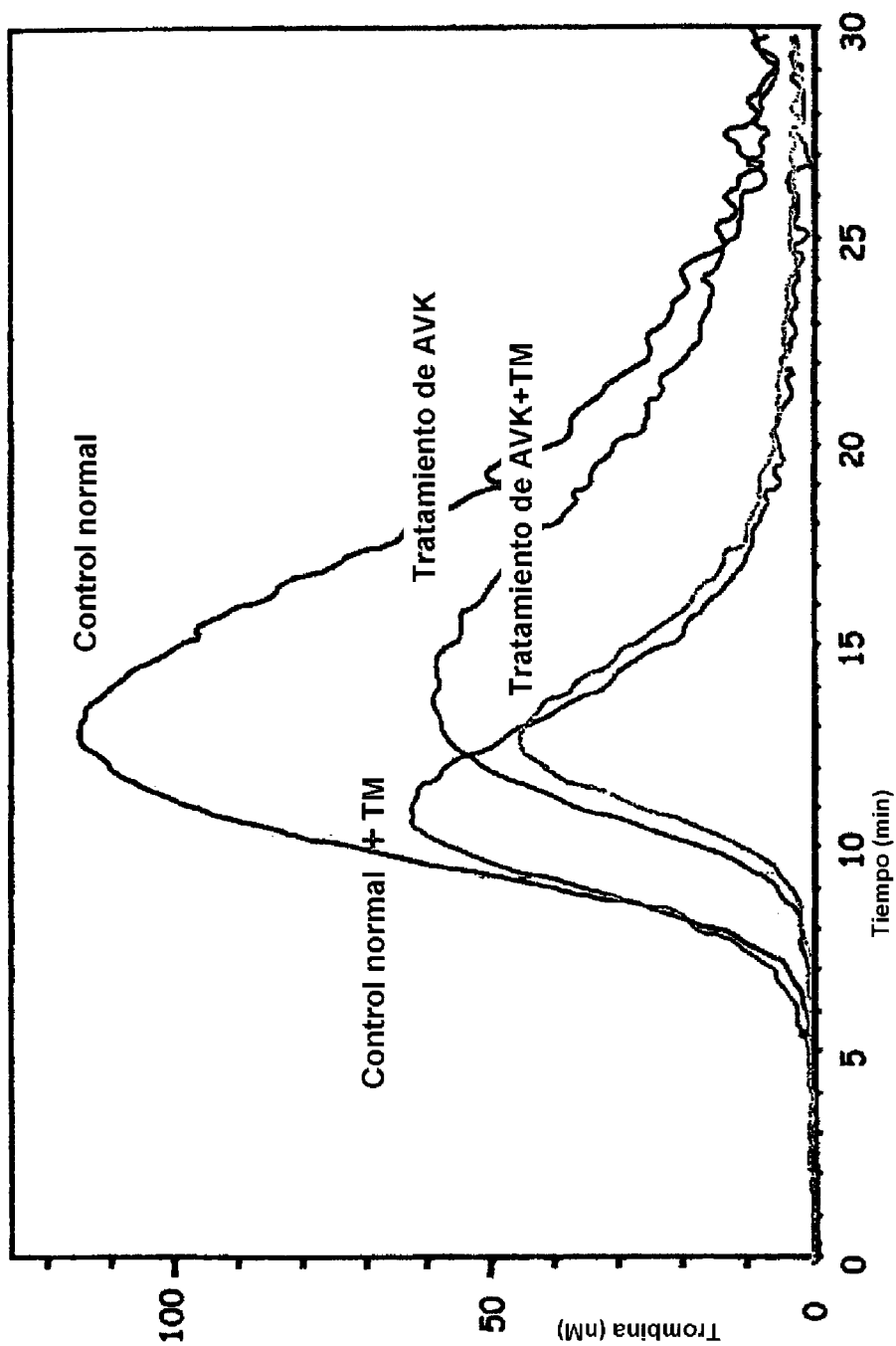
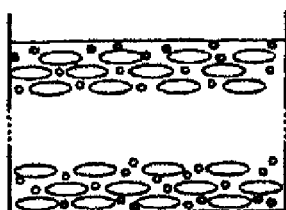
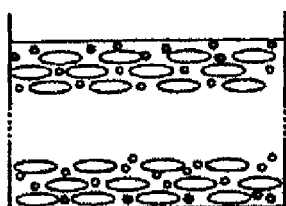


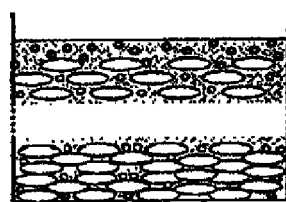
Figura 2



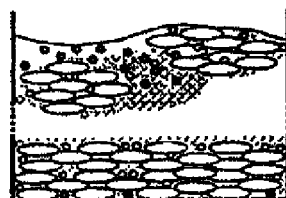
Etapa A: Sangre fluida justo después del llenado del pocillo (fig.1 t=0)



Etapa B: Sangre fluida justo antes de la coagulación (fig. 1 t=B)



Etapa C: Sangre justo después de la coagulación (fig. 1 t=C)



Etapa D: Sangre después del comienzo de la retracción (fig. 1 t=D)

Figura 4

Representación esquemática de los efectos de la sedimentación y retracción del coágulo sobre la señal fluorescente de la sangre entera coagulada

Leyenda:

Óvalos grandes: glóbulos rojos

Círculos estrellados: moléculas fluorescentes que están excitadas

Cuadrado: moléculas fluorescentes que no están excitadas

Línea superior horizontal (c.q. curvada): superficie del fluido

Línea horizontal del fondo: fondo transparente del pocillo de medida

Figura 4

¿Mejora la señal/ruido por medir en una gran superficie?

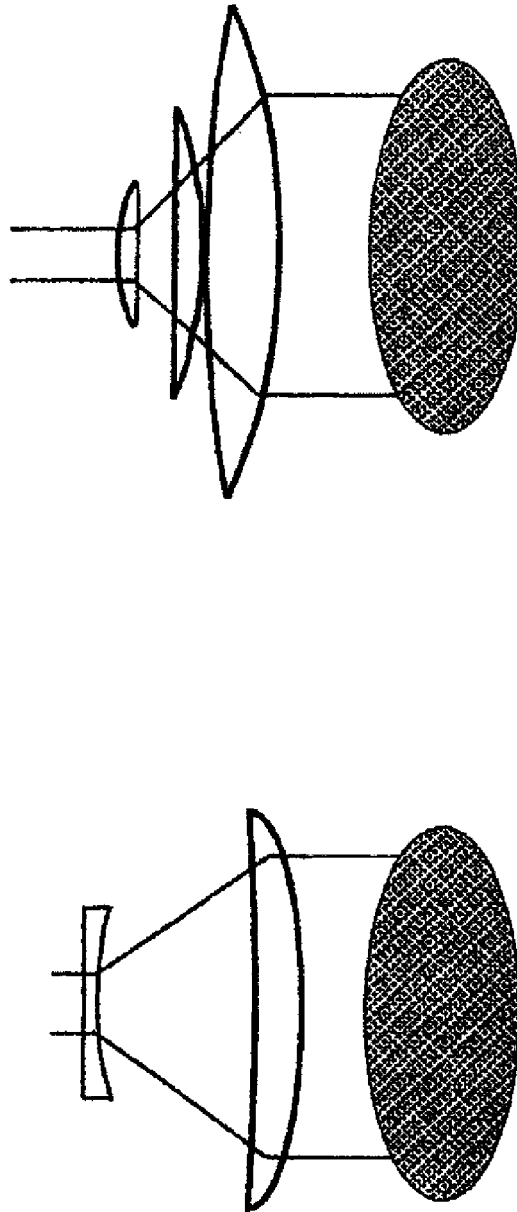
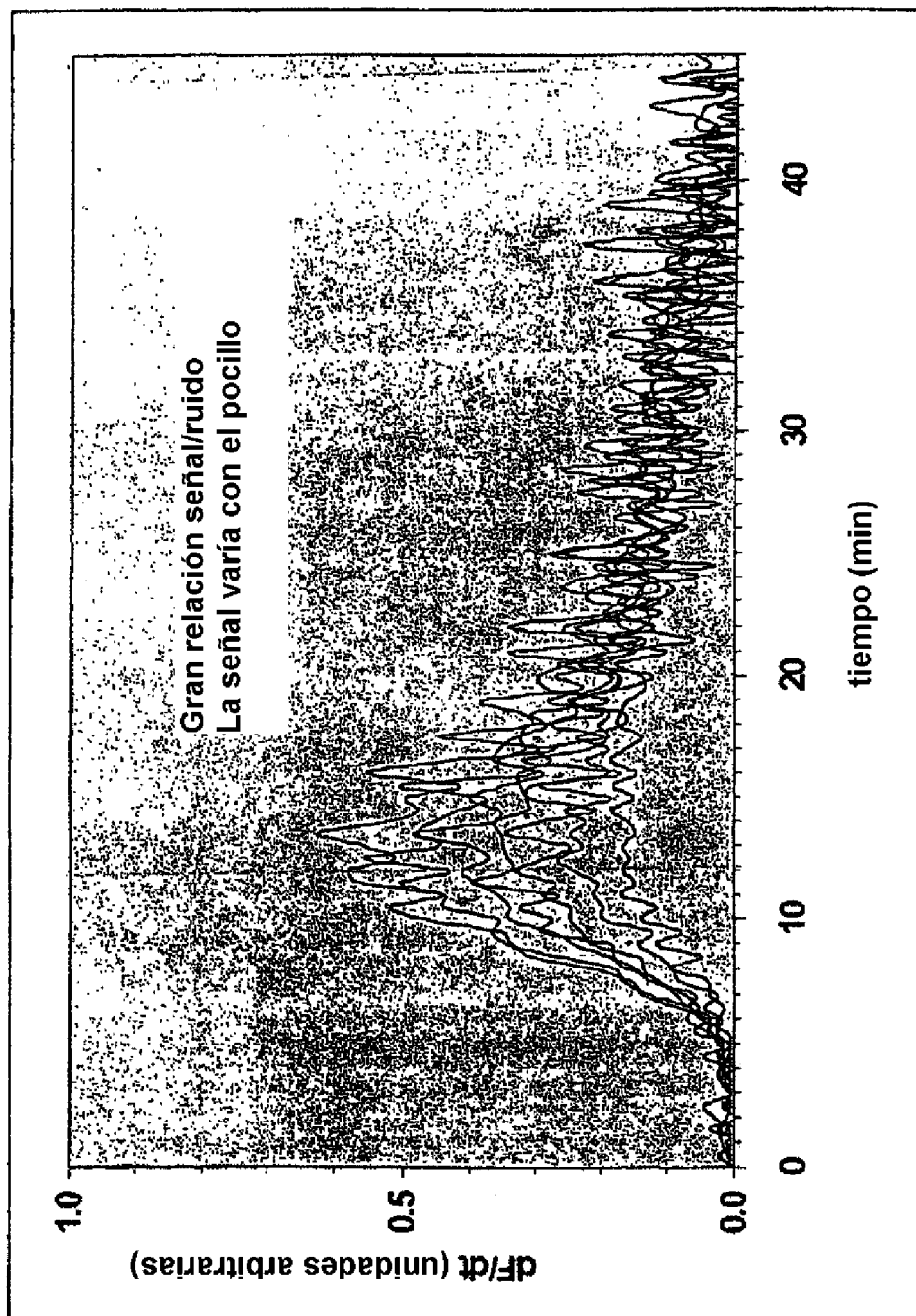


Figura 5



Capa delgada (3 mm) de sangre en pocillos de placa de microtitulación normal
Siete experimentos idénticos

Figura 6

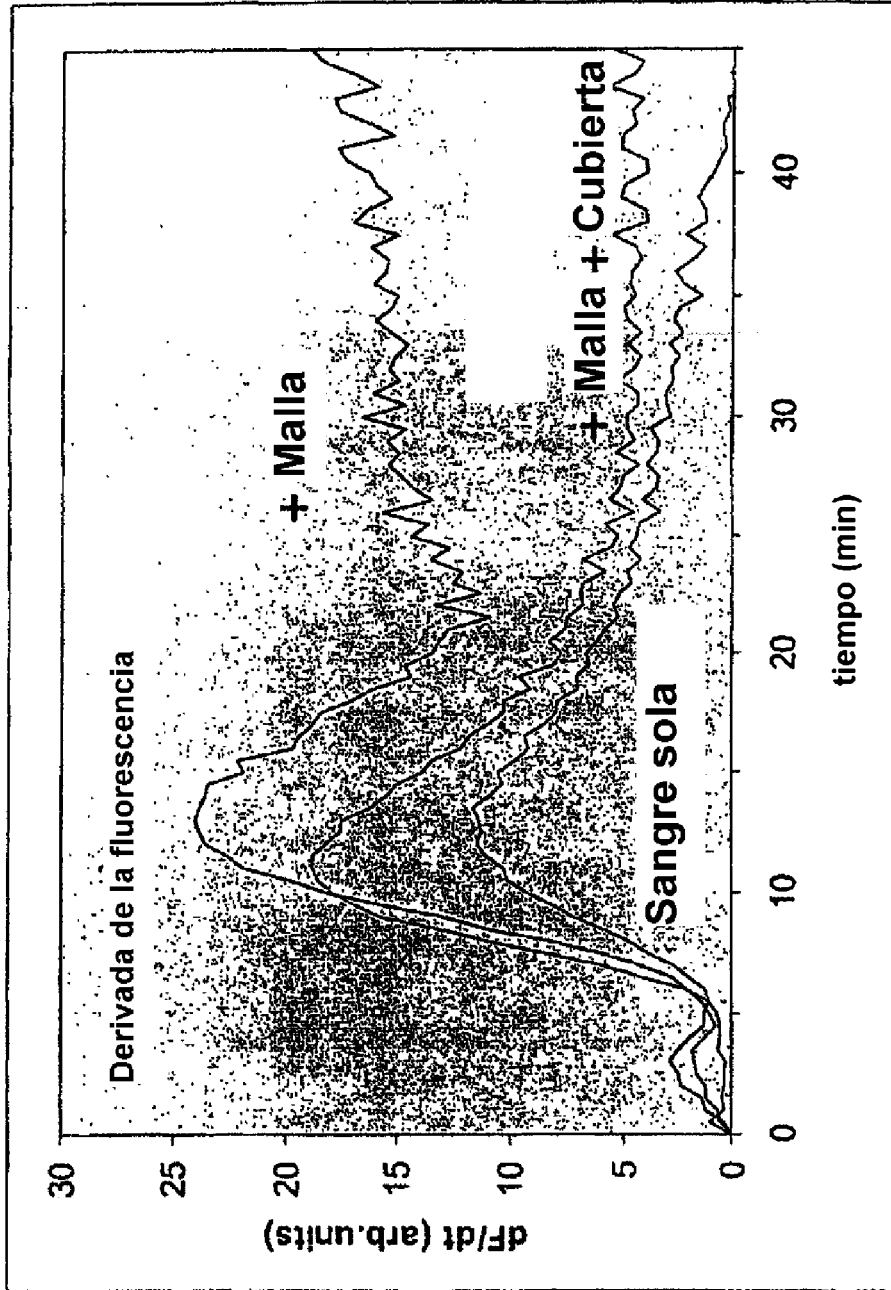
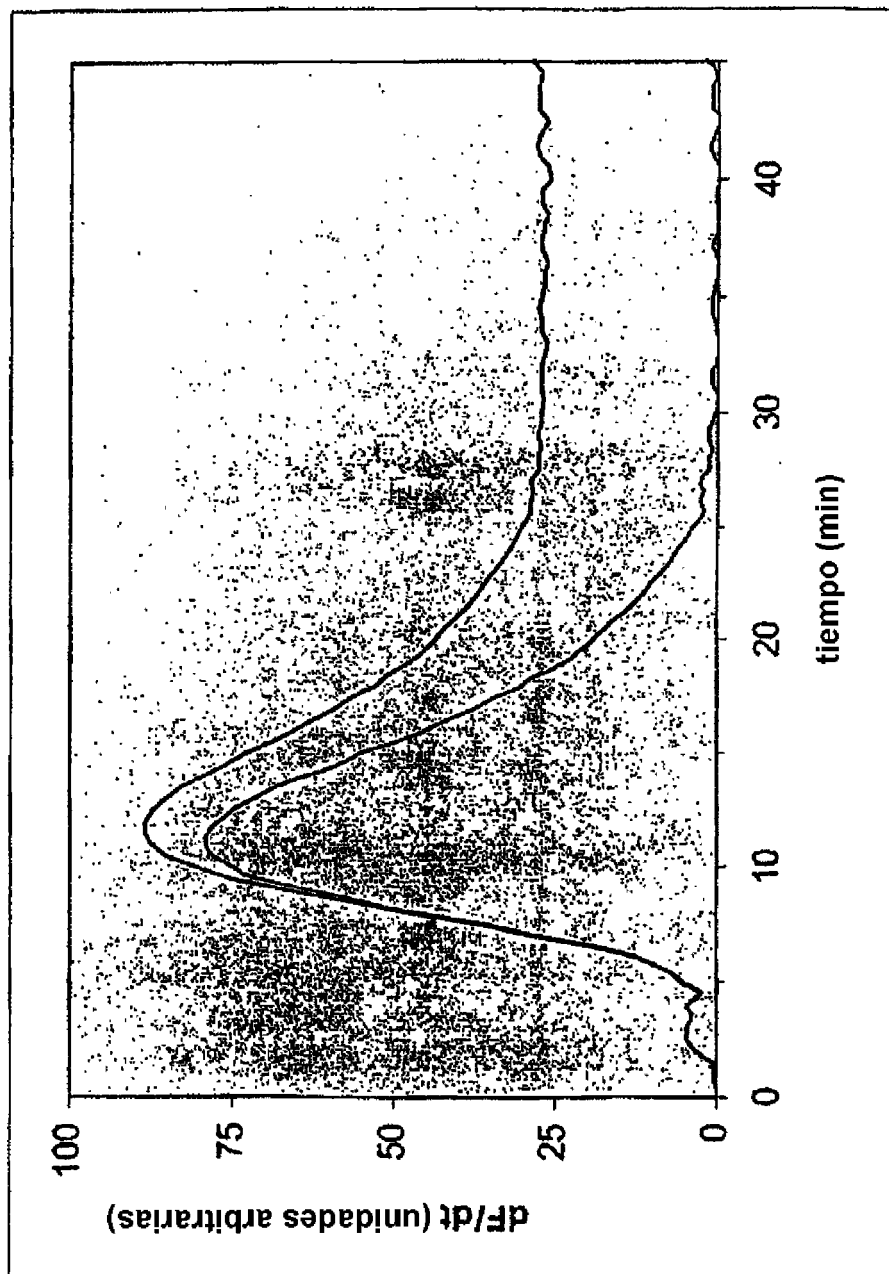


Figura 7

Capa delgada de sangre en pocillos de placa de microtitulación de gran superficie
experimentos idénticos de 32 puntos de lectura por pocillo



Capa delgada de sangre en pocillo de placa de microtitulación de gran superficie con
 con malla y cubierta. Un punto de lectura por medio de un dispositivo de recogida de luz
 (ocular de Huygens)

Figura 8

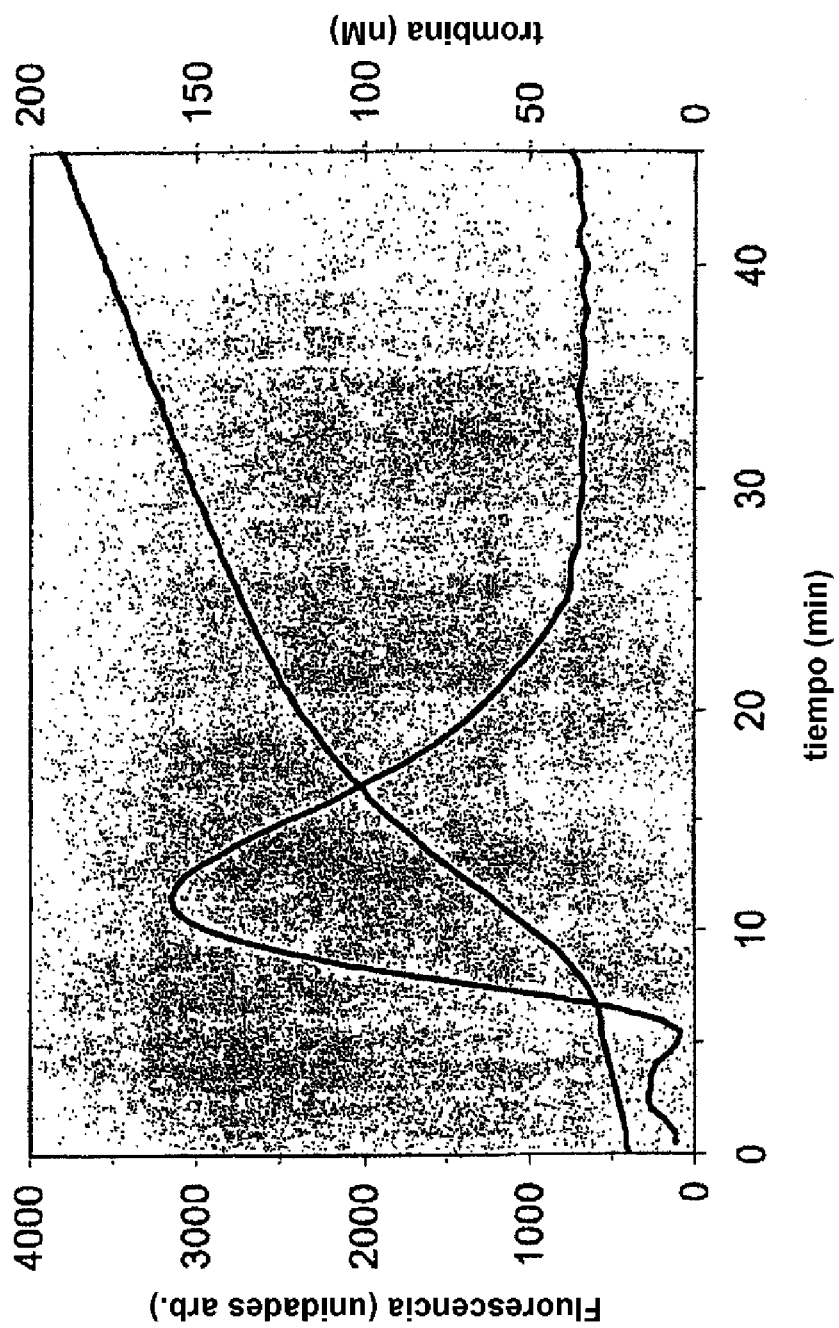


Figura 9

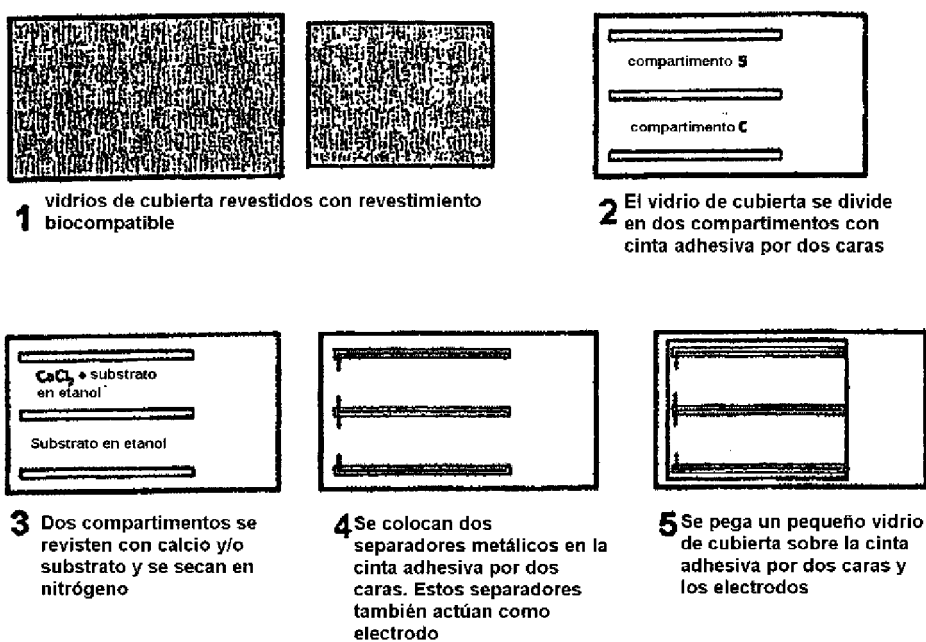


Figura 10A

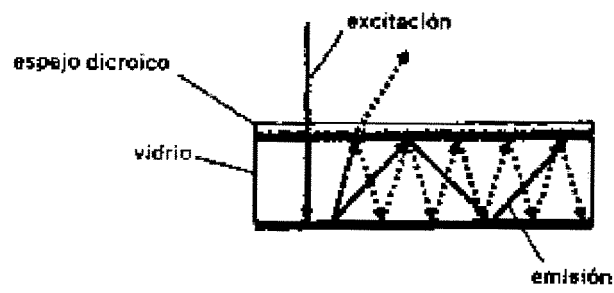


Figura 10B

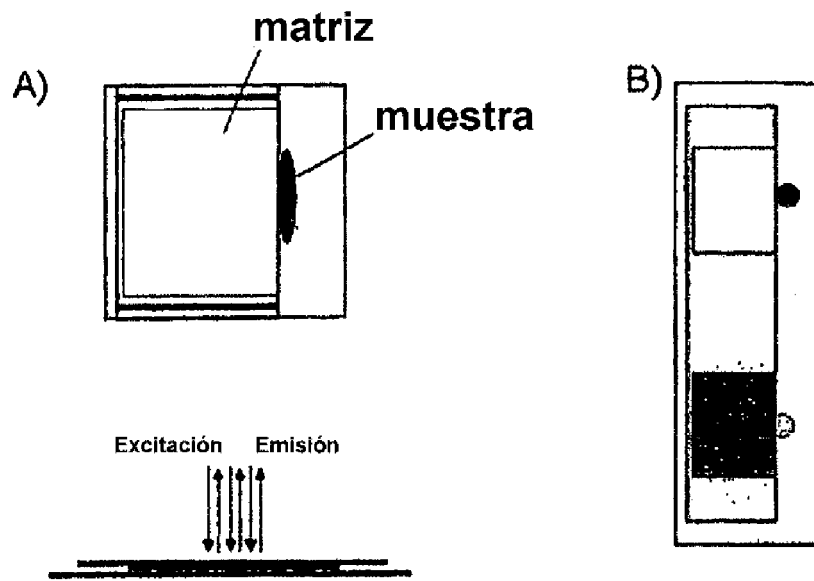


Figura 11

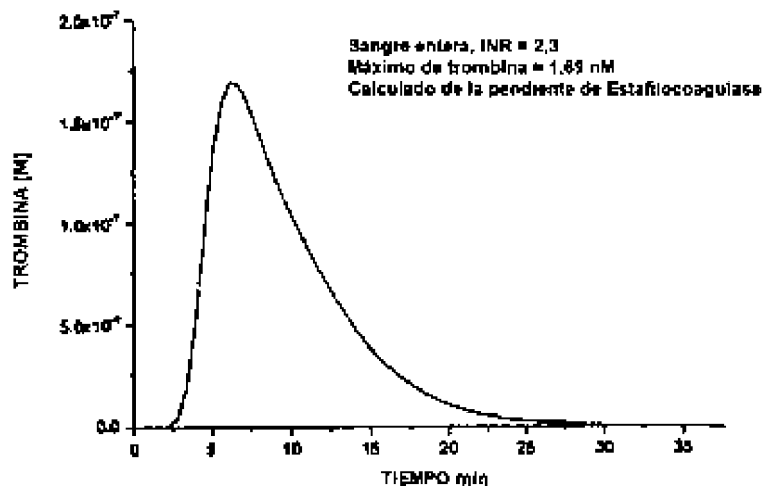
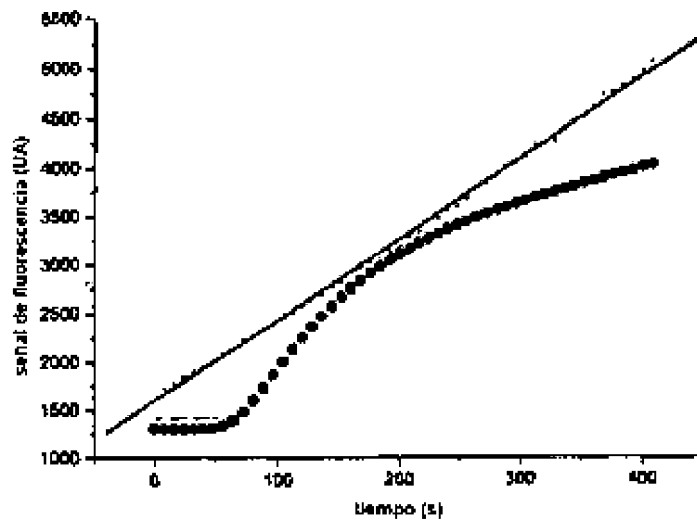


Figura 12