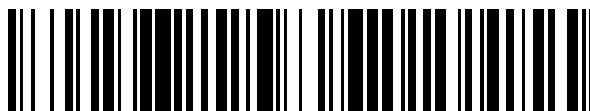


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 739**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010** **E 15194046 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3002591**

54 Título: **Composición para la determinación de las características de coagulación de un líquido de ensayo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2020

73 Titular/es:

C A CASYSO AG (100.0%)
St. Jakobs-Strasse 17
4052 Basel, CH

72 Inventor/es:

SCHUBERT, AXEL

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 797 739 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

Composición para la determinación de las características de coagulación de un líquido de ensayo

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de diagnóstico para el uso en el análisis viscoelástico de un líquido de ensayo que es una sangre entera o plasma sanguíneo, y a un recipiente que comprende el mismo. La presente invención se refiere además a un procedimiento para realizar un análisis viscoelástico en un líquido de ensayo
10 que es sangre entera o plasma sanguíneo, y al uso de la composición de diagnóstico en dicho procedimiento.

ANTECEDENTES

[0002] La coagulación de la sangre es un proceso complejo durante el cual la sangre forma coágulos sólidos.
15 Es una parte importante de la hemostasia (el cese de la pérdida de sangre de un vaso dañado) en la cual una pared dañada del vaso sanguíneo está cubierta por un coágulo de sangre para detener la hemorragia y ayudar a la reparación del vaso dañado. Los trastornos en la coagulación pueden conducir a un aumento de la hemorragia y/o trombosis y embolia.

[0003] En un individuo normal, la coagulación se inicia en cuestión de 20 segundos después de que se produce una lesión en el vaso sanguíneo que daña las células endoteliales. Las plaquetas forman inmediatamente un tapón hemostático en el sitio de la lesión. Este proceso se conoce como hemostasia primaria. La hemostasia secundaria sigue si los componentes plasmáticos llamados factores de coagulación responden en una cascada compleja para formar hebras de fibrina que fortalecen el tapón plaquetario.

[0004] La cascada de coagulación de la hemostasia secundaria tiene dos vías, la vía de activación por contacto (anteriormente conocida como la vía intrínseca) y la vía del factor tisular (anteriormente conocida como la vía extrínseca) que conducen a la formación de fibrina. Anteriormente se pensaba que la cascada de coagulación consistía en dos vías de igual importancia unidas a una vía común. Ahora se sabe que la vía principal para el inicio de la
25 coagulación sanguínea es la vía del factor tisular. Las vías son una serie de reacciones, en las que se activa un zimógeno de una serina proteasa y su cofactor, una glicoproteína, para convertirse en componentes activos que luego catalizan la siguiente reacción en cascada. Los factores de coagulación se indican generalmente mediante números romanos de I a XIII, con una "a" minúscula adjunta para indicar la forma activada.

[0005] La fibrinólisis es el proceso en el que se descompone el coágulo de fibrina. El activador de plasminógeno tisular (tPA) y la uroquinasa son los agentes que convierten plasminógeno en plasmina activa, permitiendo, por tanto, que se produzca la fibrinólisis.

[0006] La detección de la funcionalidad normal o disminuida de estos componentes de coagulación es
40 importante para evaluar los trastornos de hemostasia de los pacientes.

[0007] Se conocen varios procedimientos para medir las características de coagulación de la sangre. Algunos de estos dispositivos intentan simular el flujo natural de sangre en las venas y arterias de un sujeto vivo, mientras que otras técnicas de medición se realizan en volúmenes de sangre estáticos.

[0008] Una medición exacta de la capacidad de la sangre de un paciente para coagularse de manera oportuna y eficaz es crucial para determinados procedimientos quirúrgicos y médicos. La detección rápida y exacta de coagulaciones anormales también es de particular importancia con respecto al tratamiento adecuado que se debe dar a los pacientes que sufren trastornos de coagulación. A menudo, el estado de dichos pacientes hace necesario
50 administrar componentes sanguíneos, anticoagulantes, determinados agentes fibrinolíticos, agentes antiplaquetarios o compuestos que inducen los efectos inversos de dichos agentes. En estos casos, la dosis de tratamiento se puede adaptar al grado de un trastorno de coagulación determinado anteriormente.

[0009] Diversos dispositivos proporcionan mediciones de la coagulación de la sangre, por ejemplo, tal como se describe en los documentos (US 5.777.215), (US 6.537.819) o (US 5.777.215). Estos dispositivos miden las propiedades mecánicas del coágulo durante todo su desarrollo estructural. Estos sistemas se resumen bajo el término "procedimientos viscoelásticos", ya que detectan de forma continua las propiedades viscoelásticas del coágulo sanguíneo durante su formación y lisis.

[0010] Una medición viscoelástica proporciona información sobre varios parámetros distintos, por ejemplo, el tiempo entre la activación de la coagulación y el inicio del coágulo (tiempo de coagulación CT), la dinámica de la formación del coágulo (tiempo de formación del coágulo CFT), la firmeza del coágulo (amplitudes A5-A30 y máxima firmeza del coágulo MCF), o el grado de fibrinólisis (lisis máxima ML).

[0011] Varias referencias describen instrumentos para medir las características de coagulación de la sangre

basadas en movimientos mecánicos. Estos instrumentos controlan las propiedades elásticas de la sangre a medida que es inducida a coagularse en un entorno de cizallamiento bajo, es decir, en volúmenes de sangre estáticos. Los patrones de cambio en la elasticidad de cizallamiento permiten la determinación de la cinética de la formación de coágulos, así como la resistencia y estabilidad del coágulo formado. La fuerza y estabilidad del coágulo proporcionan información sobre la capacidad del coágulo para realizar la "función de hemostasia" (es decir, detener o prevenir el sangrado anormal) y sobre la idoneidad de la interacción plaqueta-fibrina en sangre. La cinética de la formación de coágulos proporciona principalmente información sobre la funcionalidad de los factores de coagulación. El análisis de toda esta información proporciona resultados que son convenientes para predecir el sangrado, controlar y manejar una trombosis o controlar la fibrinólisis.

[0012] Sin embargo, como el proceso de coagulación consiste en varios componentes interconectados, el uso de activadores e inhibidores específicos se aplica adicionalmente para detectar trastornos de hemostasia más específicamente.

[0013] Por tanto, los reactivos utilizados en el análisis viscoelástico consisten en un activador inicial (por ejemplo, un activador de la vía intrínseca o extrínseca) y opcionalmente uno o más inhibidores (por ejemplo, inhibidores de fibrinólisis, inhibidores de heparina, inhibidores plaquetarios) y/o uno o más factores específicos adicionales de la cascada de coagulación.

[0014] Opcionalmente, se pueden añadir otros componentes:

- Calcio (CaCl_2): El calcio se añade para la recalcificación de la muestra. Varias sustancias anticoagulantes diferentes tales como heparina, EDTA, citrato pueden impedir que las muestras de sangre se coagulen. Por lo general, los ensayos funcionales se realizan con sangre anticoagulada con citrato. El citrato compleja moderadamente el calcio de la muestra de sangre. El calcio es necesario para el proceso de coagulación, está involucrado en la formación de complejos y es cofactor para la mayoría de los factores de coagulación (por ejemplo, FI, FII, FV, FVII, FVIII, FIJAR, FX, FXI, FXIII, TF). Por lo tanto, es necesario volver a calcular la muestra para asegurar la coagulación correcta en la muestra, si la muestra fue tratada con citrato durante la extracción de sangre (mediante el uso de un tubo sanguíneo que contiene citrato).

- Fosfolípidos: Varios complejos en la cascada de coagulación son dependientes de fosfolípidos y, por lo tanto, podrían añadirse fosfolípidos adicionales.

- Estabilizadores: Para la estabilización de los reactivos entre el momento de producción y el análisis (por ejemplo, albúmina, gelatina)

[0015] Dependiendo del objetivo del diagnóstico, estos reactivos se pueden utilizar solos o en combinación: Por ejemplo, una medición con solo activador intrínseco en la muestra puede combinarse con una medición con activador intrínseco y una cantidad suficiente de inhibidor de heparina (por ejemplo, heparinasa) en la muestra para detectar la presencia de heparina en el líquido de ensayo; se aplica una combinación de activador extrínseco e inhibidor plaquetario (por ejemplo, citocalasina D) en la muestra para determinar la actividad del fibrinógeno sin aporte plaquetario en el líquido de ensayo.

[0016] Hay un concepto de reactivo para mediciones viscoelásticas en la bibliografía (TEG modificado por ReoPro: Wenker y col.: Thrombelastography, The Internet Journal of Anesthesiology, 2000, Volume 1 Number 3; (<http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ija/vol1n3/teg.xml>); Ruttman y col.: Hemodilution Enhanced Coagulation Is Not Due to Platelet Clumping, Anesthesiology 2004; 101: A150; TEG modificada con recombiplastina y ReoPro: http://www.transfusionguidelines.org.uk/docs/pdfs/bbt_app-use_teg-sop-example.pdf; TEG modificada por TF y trasilol: Tanaka y col.: Evaluation of a novel kallikrein inhibitor on hemostatic activation in vitro, Thrombosis Research, Volume 113, Issue 5, 2004, Pages 333-339) que se basa en la combinación de reactivos activadores comercialmente disponibles destinados a otros ensayos, tales como el activador de tiempo de protrombina Innovina o Recombiplastina®, combinado con solución y fármacos CaCl_2 hechos a medida, tales como ReoPro® (abciximab) y Trasylol® (aprotinina). Esto conduce a una baja estandarización, muchas etapas de pipeteo y muchas fuentes de error.

[0017] Existe un sistema de reactivos para mediciones viscoelásticas comercializado por Pentapharm, que se basa en reactivos estandarizados, la mayoría de los cuales se proporcionan al cliente en forma líquida, que son pipeteados por el usuario en el vaso de ensayo utilizando procedimientos operativos estandarizados. Esto estandariza la aplicación; sin embargo, todavía requiere varias etapas de pipeteo para el análisis. Por ejemplo, para realizar un ensayo FIBTEM junto con un ensayo de control EXTEM, el pipeteo de sangre, la solución de CaCl_2 , el activador extrínseco y un inhibidor plaquetario pueden resultar en la realización de un total de 8 etapas de pipeteo (incluido tres veces el cambio de la punta durante un procedimiento de ensayo) y la necesidad de 3 reactivos diferentes que tienen que ser manipulados por el usuario. Esto proporciona un requisito para una capacitación, consume tiempo y es una fuente potencial de errores.

[0018] Hay otros sistemas de reactivos en el mercado, que se basan en una variedad de reactivos. Algunos de ellos son líquidos y deben pipetarse en la taza (por ejemplo, solución de CaCl_2), otros se secan en el vaso de ensayo (tales como heparinasa) y otros se suministran en viales pequeños, en una cantidad destinada a un ensayo. Una característica de estos reactivos es que cada reactivo se proporciona típicamente solo y, por lo tanto, se requieren 5 varias etapas al menos para ensayos que requieren más de un reactivo activo.

[0019] En consecuencia, en el pasado se han hecho algunos esfuerzos para proporcionar un sistema de reactivos más sencillo para las mediciones viscoelásticas de sangre o componentes sanguíneos:

- 10 • secarlos directamente en el vaso que lleva el volumen de la muestra durante la medición
- componer combinaciones líquidas estables de los reactivos en la concentración de trabajo

[0020] Una deficiencia de la estrategia de secado de reactivos activos directamente en el vaso de ensayo es que estos están hechos típicamente de plástico y son ligeros, lo que hace que el llenado de estos vasos en las líneas de dispensación de reactivos automatizadas sea más difícil. Esto hace que sean necesarias etapas de llenado manual o el desarrollo de equipos especializados, y ambos son costosos. Otra deficiencia de esta estrategia es que los componentes activos o estabilizadores pueden interferir con la fuerza de adhesión del coágulo de sangre en las superficies del vaso, que es necesaria para realizar mediciones correctas. Por ejemplo, se ha demostrado una 15 disminución de la adhesión del coágulo después de la incubación de la solución de albúmina en el vaso (la albúmina es un estabilizador típico que se usa para estabilizar todo tipo de proteínas en reactivos):

	Control			Albúmina 1 %		
	TC	FCM	LM	TC	FCM	LM
muestra 1	139	62	0	136	41	66
muestra 2	123	64		119	47	85
muestra 3	121	65	0	130	42	79
muestra 4	133	63	0	135	34	79
media	129	63,5	0,5	130	41	77,25
sd	8,5	1,3	1,0	7,8	5,4	8,0

Tabla 1: resultados de mediciones INTEM con y sin incubación previa con solución de albúmina.

25 **[0021]** Otra estrategia posible para simplificar la manipulación de los reactivos es combinar los diferentes reactivos necesarios para un ensayo en fase líquida en su concentración de trabajo. El principal problema aquí es la interacción de las diferentes sustancias mientras permanecen juntas durante un período prolongado. Algunos componentes afectan negativamente a la estabilidad de cada uno cuando permanecen juntos en la fase líquida a concentraciones más altas; por ejemplo, CaCl_2 altera la estabilidad del reactivo del factor tisular en fase líquida con el 30 tiempo.

[0022] Además, si estos reactivos combinados se suministraran en una cantidad suficiente para exactamente un ensayo, surgiría otro problema: En este caso, la porción muy pequeña de reactivo líquido podría adherirse a partes del recipiente de reactivo o la tapa y, por lo tanto, podría no mezclarse lo suficiente con el líquido de ensayo cuando 35 se realiza el análisis.

[0023] Una estrategia propuesta para resolver los aspectos mencionados fue descrita por Kolde y col. en la solicitud de patente estadounidense 20040071604. En esta solicitud, se presenta un sistema de vasos para análisis viscoelásticos, en el que el extremo inferior del vaso se divide en varias cámaras de reactivo. Esto permite colocar los 40 reactivos de forma independiente en las diferentes cámaras, sin mezclarlos y luego liofilizar los reactivos.

[0024] Sin embargo, las desventajas de esta solución incluyen la necesidad de un proceso de pipeteo muy exacto, ya que las cámaras de reactivo separadas son muy pequeñas y también el problema de que las gotas de

reactivo todavía podrían mezclarse antes del liofilizado por vibraciones presentes en la línea de llenado del reactivo. Otro problema es el posible secado al aire de las pequeñas gotas de reactivo durante el procesamiento en condiciones ambientales antes de que comience el proceso de liofilización. Una vez más, está presente el problema de la manipulación automática del plástico pequeño y, por lo tanto, muy ligero al usar líneas de llenado de reactivo estándar.

5

[0025] La mayoría de los procedimientos de ensayo de coagulación en el uso rutinario de laboratorio solo miden el tiempo desde la adición de un activador a la muestra hasta que se puede detectar la primera formación inicial de un coágulo de fibrina (= tiempo de coagulación). Se detienen en este punto y no se realiza ninguna otra medición. Esto tiene las implicaciones de que en estos procedimientos no es necesaria una adhesión firme de la sangre a las superficies de la célula de medición. Por tanto, la variedad de analizadores y reactivos disponibles para la evaluación de los tiempos de coagulación con dichos procedimientos no tiene que manejar los problemas particulares relacionados con las mediciones viscoelásticas.

10

[0026] El documento EP 0 972 203 describe un reactivo para determinar aPTT, que comprende al menos una proteína de coagulación, fosfolípidos y un activador de la coagulación intrínseca en forma co-liofilizada. Sin embargo, aquí surge el problema de que todos los componentes necesarios para realizar el análisis están en contacto inmediato entre sí. Por lo tanto, pueden surgir problemas con respecto a la estabilidad a largo plazo o incompatibilidades mediante el uso de sustancias en esta forma.

15

[0027] El documento WO2008093216 describe composiciones de diagnóstico, recipientes, procedimiento y usos para realizar una sola medición viscoelástica que carece, sin embargo, del aspecto de proporcionar los reactivos en forma separada espacialmente.

20

[0028] El documento US4755461 instruye a incorporar el factor tisular y CaCl_2 en diferentes comprimidos, ya que se encontró que estos reactivos eran incompatibles incluso cuando se proporcionaron en forma seca en una mezcla.

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0029] Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición diagnóstica, que permita un procedimiento seguro, reproducible y fácil de usar para diferentes ensayos en sistemas viscoelásticos. Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar una composición de diagnóstico que se adapte específicamente a un único análisis de una muestra de sangre y tenga una estabilidad de reactivo superior con respecto a las composiciones de la técnica anterior. Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento de diagnóstico que proporcione resultados confiables y reproducibles, sea fácil de manejar y que proporcione un sistema estandarizado para la determinación de las características de coagulación de una muestra de sangre. Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una composición de diagnóstico del tipo anterior, que tenga una estabilidad mejorada a largo plazo.

35

[0030] Estos objetos se logran mediante la composición de diagnóstico de la reivindicación 1, el recipiente de la reivindicación 9, el procedimiento para realizar un análisis viscoelástico en un líquido de ensayo de la reivindicación 12 y el uso de la reivindicación 14.

40

[0031] Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

45

[0032] Mediante el uso de la composición diagnóstica de la invención, los ensayos se pueden realizar de la siguiente manera: un volumen definido de una muestra, a saber, sangre entera o plasma sanguíneo, se añade directamente en un recipiente 1 que contiene la composición diagnóstica. Después de disolver la composición en la muestra de sangre, la mezcla resultante se pipetea desde el recipiente 1 en el vaso de medición 2 de un aparato de medición 4. El vaso 2 se coloca entonces en una posición de manera que el pasador 3 se sumerja en el líquido en el vaso de ensayo (comp. con la Figura 2).

50

[0033] Por lo tanto, el usuario solo necesita 4 etapas de pipeteo para realizar cada ensayo (en el sistema de líquidos de la técnica anterior hasta 8 etapas, ver arriba) y no es necesario cambiar la punta de la pipeta.

55

[0034] Por lo tanto, está claro que el sistema actual para la determinación de las características de coagulación de una muestra de sangre se puede manejar más fácilmente, haciendo así que la probabilidad de errores sea menor, lo que puede deberse a una línea de acción imprecisa por parte de un operador (potencialmente menos experimentado).

60

[0035] Según la invención, los constituyentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino en forma separada espacialmente, donde se incluye cada uno de los constituyentes en gránulos separados espacialmente.

[0036] Esto permite una mejor estabilidad a largo plazo de la composición sin deteriorar sus demás características.

65

[0037] De ahí pueden surgir otras ventajas como, por ejemplo, una mayor reproducibilidad de los resultados que se deben lograr y, por lo tanto, un mayor grado de estandarización.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0038] Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de una descripción de realizaciones con referencia a las figuras.

10 **[0039]** En las Figuras:

La Figura 1 es un ejemplo de diagrama que muestra una medición tromboelastométrica típica;

15 La Figura 2 muestra un aparato de medición 4 para el análisis tromboelastométrico;

La Figura 3 es una ilustración de un vaso de medición 2 de un aparato de medición 4 de la técnica anterior;

20 Las Figuras 4A, B, C son vistas transversales esquemáticas de tres realizaciones preferidas de un recipiente 1 de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0040] En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de diagnóstico para su uso en el análisis viscoelástico de un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo, que comprende:

- a) al menos un activador de la coagulación que se selecciona de factor tisular (TF);
- b) una sal de calcio, preferentemente CaCl_2 , en una cantidad suficiente para asegurar la recalcificación del líquido de ensayo; y,
- 30 c) uno o más inhibidores de heparina, plaquetas o fibrinólisis;

caracterizado porque

los componentes están presentes en una forma sustancialmente seca y en una cantidad suficiente para realizar un único análisis viscoelástico de un líquido de ensayo especificado,

35 y donde los constituyentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino en forma separada espacialmente, donde se incluye cada uno de los constituyentes en gránulos separados espacialmente.

[0041] La sal de calcio es preferentemente CaCl_2 .

40 **[0042]** La composición de diagnóstico o mezcla de reacción de la presente invención comprende constituyentes, que son por sí mismos conocidos en la materia. Sin embargo, una diferencia con los enfoques de la técnica anterior es que la mezcla de estos constituyentes se proporciona en una forma sustancialmente seca.

[0043] "Sustancialmente" seco en el contexto de la invención significa un estado, en el que la mezcla está sustancialmente libre de cualquier líquido o humedad, en particular carece de agua. Sin embargo, el agua o cualquier otro líquido puede estar presente como residuo en la mezcla, pero solo en una medida, que no influye negativamente en la estabilidad de la composición general. En particular, debe excluirse que se produzca una interacción entre los diferentes constituyentes, que afecte negativamente a la estabilidad. Debe aceptarse una cantidad restante de líquido, preferentemente agua, con una composición de hasta el 10 % en peso.

50 **[0044]** La cantidad suficiente para realizar un único análisis viscoelástico de un líquido de ensayo especificado, por ejemplo, una muestra de sangre, es la cantidad de todos los constituyentes en mezcla, que proporciona la concentración requerida de los reactivos en el análisis final de las características de coagulación de la muestra de sangre, es decir, en el vaso 2 de un aparato de medición 4. Por lo tanto, no es necesario separar adicionalmente la composición de diagnóstico antes o después de disolverla en un líquido.

[0045] Además, esto se consigue al disolver las sustancias en el propio líquido de ensayo (sangre entera o plasma sanguíneo), no disolviendo los constituyentes en una cantidad de diluyente líquido que lleve a la concentración de trabajo final.

60 **[0046]** Es un elemento importante de la presente invención que los constituyentes no estén presentes en una mezcla de sustancias, sino en una forma separada espacialmente. Esto evita problemas relacionados con la estabilidad.

65 **[0047]** La separación espacial de los constituyentes se realiza mediante la inclusión de cada constituyente en

un material portador separado. Este término significa que cada uno de los constituyentes se incluye en entidades separadas espacialmente, a saber, gránulos. El término "material portador separado" no significa necesariamente que los materiales utilizados sean químicamente diferentes. Solo significa que están espacialmente separados entre sí.

5 **[0048]** El portador adopta la forma de gránulos. Estos gránulos pueden producirse mediante procedimientos que son conocidos per se en la técnica anterior. Sin embargo, se prefiere usar uno de los dos procedimientos de producción de gránulos, que se describirán brevemente a continuación:

10 a) El constituyente respectivo en solución se mezcla con un material portador adecuado, cuya mezcla se convierte a continuación en forma de pulverizador. Este pulverizador, que contiene gotas de la mezcla, se congela por choque en nitrógeno líquido, se calienta a continuación bajo una atmósfera protectora y se almacena en un recipiente hermético al aire (tal como un vial).

15 b) Los gránulos se producen como en a), sin embargo, la mezcla de partida no contiene ningún componente. El constituyente se proporciona como solución y se deja caer sobre los gránulos bajo una atmósfera protectora. Después de secarse sobre los gránulos, los gránulos se envasan en un recipiente hermético.

[0049] En una realización preferida, el material portador comprende al menos un carbohidrato, por ejemplo, sacarosa, lactosa o celulosa. El material portador preferentemente no muestra influencia significativa en el
20 comportamiento de coagulación, el comportamiento de formación de coágulos o el comportamiento de lisis de coágulos.

[0050] Los activadores de la coagulación incluyen activadores intrínsecos y/o extrínsecos.

25 **[0051]** El activador extrínseco de la coagulación es el factor tisular (TF) y se selecciona más preferentemente de entre TF lipídado o rTF.

[0052] Los activadores intrínsecos de la coagulación incluyen celite, ácido elágico, sulfatita, caolín, sílice, ARN o sus mezclas.

30 **[0053]** Como segunda característica, la composición de diagnóstico de la presente invención comprende una sal de calcio tal como CaCl_2 , donde CaCl_2 está preferentemente presente en una cantidad de aproximadamente 1-100 mmol/ml de líquido de ensayo. Tal como se mencionó anteriormente, la cantidad de CaCl_2 debe ser suficiente para asegurar la recalcificación del líquido de ensayo, es decir, sangre entera o plasma sanguíneo, si la muestra se
35 descalcificó antes. Resultó que la cantidad de 3-30 mmol/ml es óptima para lograr este requisito. Con el fin de determinar la cantidad requerida de CaCl_2 que debe estar contenido en la composición de diagnóstico de forma aún más exacta, debe conocerse el volumen exacto del líquido de ensayo que se debe recoger del paciente, así como la cantidad de reactivo descalcificante empleado.

40 **[0054]** La composición de diagnóstico de la presente invención contiene uno o más inhibidores, que se seleccionan de entre uno o más de un inhibidor plaquetario, inhibidor de fibrinólisis o inhibidor de heparina.

[0055] Esos inhibidores se pueden usar y combinar en función de las demandas diagnósticas exactas, por ejemplo, el inhibidor plaquetario puede ser un inhibidor del citoesqueleto o un antagonista de la GPIIb/IIIa. De manera
45 similar, el inhibidor de fibrinólisis se puede seleccionar, por ejemplo, de entre aprotinina, ácido tranexámico o eaca; el inhibidor de heparina se puede seleccionar, por ejemplo, de entre péptidos relacionados con heparinasa, protamina o protamina. Un factor de coagulación se puede seleccionar, por ejemplo, de entre uno o más factores de coagulación o factores de coagulación activados, preferentemente FXa o FVa o proteína C activada o FVIIa. Sin embargo, se observa que esto es solo una selección preferida y se pueden utilizar inhibidores adicionales si es necesario.

50

[0056] En una realización preferida, la composición de diagnóstico también puede contener uno o más estabilizadores, donde el estabilizador preferentemente es albúmina o gelatina.

55 **[0057]** En una realización preferida, la composición de diagnóstico también puede contener uno o más fosfolípidos, donde los fosfolípidos pueden ser una composición de diferentes fosfolípidos como fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidiletanolcolina. Por ejemplo, se pueden usar mezclas de fosfolípidos extraídos del cerebro de conejo.

60 **[0058]** La presente composición de diagnóstico puede tener la siguiente constitución en modalidades preferidas:

- activación extrínseca insensible a la heparina: Combinación del activador extrínseco, factor tisular, del inhibidor de heparina, del estabilizador y de CaCl_2

65

- activación extrínseca sin activación plaquetaria: Combinación del activador extrínseco, factor tisular, del inhibidor y plaquetario, del estabilizador y de CaCl_2

- activación extrínseca sin activación plaquetaria, insensible a la heparina: Combinación del activador extrínseco, factor tisular, del inhibidor plaquetario, del inhibidor de heparina y del estabilizador y de CaCl_2

- activación extrínseca con inhibición de la fibrinólisis: Combinación del activador extrínseco, factor tisular, del inhibidor de la fibrinólisis y del estabilizador y de CaCl_2

- activación extrínseca con inhibición de la fibrinólisis, insensible a la heparina: Combinación del activador extrínseco, factor tisular, del inhibidor de la fibrinólisis, del inhibidor de heparina y del estabilizador y de CaCl_2

- activación extrínseca con un factor de coagulación adicional, insensible a la heparina: Combinación del activador extrínseco, factor tisular, de un factor de coagulación adicional, del inhibidor de heparina y del estabilizador y de CaCl_2

[0059] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un recipiente según la reivindicación 9 (1), que comprende la composición de diagnóstico tal como se definió anteriormente. El recipiente 1 preferentemente adopta la forma de un vial o una cubeta. El recipiente 1 está formado por un material (por ejemplo, plástico o vidrio) que no está corroído o afectado de otro modo por los reactivos a rellenar o el líquido de ensayo a rellenar.

[0060] El recipiente 1 puede tener forma cilíndrica, pero su forma no necesariamente tiene que ser cilíndrica. El recipiente 1 puede tener una forma que reduce su perfil lateral interno de la abertura superior a la parte inferior como, por ejemplo, una forma cónica tal como se indica en la Figura 4 o al menos una forma parcialmente cónica. Esto proporciona una mejor manipulación de las cantidades generalmente pequeñas de mezcla de reactivos líquidos. El uso de viales de fondo plano con un diámetro más pequeño reduciría este problema, pero dichos viales podrían tener un diámetro de abertura demasiado estrecho para manipularse con el equipo de pipeteo estándar utilizado en conexión con dispositivos de diagnóstico como, por ejemplo, el trombo-elastómetro ROTEM. (En cuanto al diseño del sistema ROTEM y cómo utilizarlo, se remite a la publicación de US 5,777,215.)

[0061] Además, estos viales pequeños podrían ser más difíciles de controlar para los sistemas de procesamiento automatizado comunes y, por lo tanto, podrían aumentar los costes de producción.

[0062] La sección transversal de un recipiente 1 básicamente con simetría axial de una realización preferida se muestra en la Figura 4A. Sin embargo, cabe señalar explícitamente que la presente invención no se limita a esta, y también se pueden usar formas en forma de U, rectangulares o similares.

[0063] Tal como se mencionó anteriormente, el recipiente 1 puede cerrarse o sellarse mediante una tapa o similar para evitar una pérdida de reactivos, o una invasión de contaminantes, agua, etc.

[0064] En una modalidad adicional, el recipiente 1 se diseña de manera que pueda usarse directamente como el vaso de medición 2 del aparato de medición viscoelástico 4. En otras palabras, se puede realizar un análisis viscoelástico de manera que se proporcione un recipiente 1 respectivo, se añada el líquido de ensayo en el recipiente 1 y la medición se realice directamente en el recipiente 1. En este caso, solo la dispensación de sangre en el recipiente debe realizarse como una etapa de transferencia de líquido, que puede realizarse mediante el uso de una pipeta manual, una pipeta automatizada, un dispensador automatizado o cualquier otro equipo de transferencia de líquido.

[0065] En esta realización, el recipiente 1 puede diseñarse mediante la combinación de dos materiales, por ejemplo, vidrio y plástico o vidrio y una cubierta superficial. En este contexto, la parte del recipiente hecha de vidrio no necesariamente tiene que sujetar toda la parte inferior de la parte plástica, sino que puede construirse según la Figura 4C.

[0066] En la Figura 4B y C, se puede observar una realización adicional de la invención. El recipiente 1 (por ejemplo, una cubeta) puede incorporarse en una estructura más grande, por ejemplo, un artículo de vidrio, que proporciona algunas ventajas técnicas: esta configuración puede proporcionar una sujeción para el recipiente.

[0067] En estas modalidades, se excluye la posible activación de la coagulación en el líquido de ensayo por la superficie de vidrio, mientras que todavía se utilizan las propiedades de sellado superiores del material de vidrio en comparación con el material plástico. El efecto similar de suprimir la posible activación de la coagulación en el líquido de ensayo por la superficie de vidrio se puede lograr cubriendo la superficie de vidrio (o al menos la porción interna de la superficie de vidrio) con una capa de una o más sustancias que no son capaces de activar la coagulación si están en contacto con sangre o componentes sanguíneos.

[0068] A modo de comparación, en la Figura 3 se ilustra una copa de medición 2 de la técnica anterior según el documento US 2004/0071604:

Se proporciona un recipiente 1, que sirve como soporte de reactivo y recipiente de medición (es decir, se puede considerar como un vaso de medición 2) para análisis usando diversos procesos analíticos, y tiene una zona que se divide en al menos dos cámaras (6a, 6b, 6c) por una o más barras que se extienden desde la pared del recipiente o la base del recipiente, donde las cámaras se disponen de modo que los reactivos líquidos o sólidos se pueden introducir en las mismas sin que puedan mezclarse por difusión o encontrarse una con otra. El recipiente 1 se utiliza para secar o liofilizar con cámaras completamente o parcialmente llenas y sirve al mismo tiempo como un recipiente de medición después de volver a disolver el material seco mediante la adición de agua, solución de reactivo o la muestra presente en fase acuosa.

10 **[0069]** En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para realizar un análisis viscoelástico en un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre total o plasma sanguíneo, que comprende las etapas de:

- 15 a) proporcionar un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo;
- b) proporcionar un recipiente 1 según una de las reivindicaciones 9-11;
- c) añadir el líquido de ensayo en dicho recipiente 1, disolviendo así la composición de diagnóstico contenida en el mismo;
- d) transferir la mezcla de dicho líquido de ensayo y dicha composición de diagnóstico a un vaso 2 y ponerla en un aparato 4 adecuado para realizar un análisis viscoelástico,
- 20 o
- colocar el recipiente 1 en un aparato 4 adecuado para realizar un análisis viscoelástico; y
- e) realizar el análisis viscoelástico de dicha mezcla.

[0070] Como ya se mencionó anteriormente, el líquido de ensayo es sangre entera o plasma sanguíneo, preferentemente de mamífero, más preferentemente sangre entera o plasma sanguíneo humano.

[0071] La etapa c) del procedimiento de la presente invención preferentemente toma alrededor de 1-60, más preferentemente 2-10 seg y más preferentemente es alrededor de 5 s. Después de ese tiempo, la mezcla de la composición de diagnóstico y la muestra de sangre debe transferirse rápidamente al vaso de medición 2 del aparato de medición 4. Esto se hace en la etapa d) pipeteando manual o automáticamente la mezcla del recipiente 1 y transfiriéndola de este modo al aparato 4, es decir, al vaso de medición 2 del aparato 4.

[0072] Como alternativa, si el recipiente 1 de la presente invención es el vaso de medición 2, la medición se realiza directamente en el recipiente 1. En este caso, la etapa d) puede omitirse. El aparato 4 es preferentemente un dispositivo adecuado para mediciones viscoelásticas, por ejemplo, los dispositivos descritos en (US 5.777.215), (US 6.537.819) o (US 5.777.215).

[0073] Un ejemplo de ese aparato 4 se muestra en la Figura 2: Después de la formación del coágulo entre el vaso 2 (cubeta) y el pasador 3, el coágulo en sí se estira por el movimiento del pasador 3 con respecto al vaso 2. La detección de los parámetros característicos del coágulo se basa en el acoplamiento mecánico del vaso 2 y el pasador 3 por el coágulo. Esto solo es posible si el coágulo se adhiere a las superficies del vaso 2 y del pasador 3. Por lo tanto, se requiere sustancialmente una adhesión firme en las superficies del vaso 2 y del pasador 3 para el análisis viscoelástico.

45 **[0074]** El procedimiento de la presente invención comprende dicho análisis viscoelástico de una muestra de sangre para determinar sus características de coagulación, donde dicho análisis viscoelástico en el sentido más amplio es la medición de un movimiento relativo de una cubeta que contiene una muestra de sangre con respecto a un punzón. El análisis comprende preferentemente la determinación del tiempo de coagulación, el tiempo de formación del coágulo y la firmeza del coágulo a lo largo del tiempo, incluidos los efectos fibrinolíticos.

50 **[0075]** En la práctica, se pueden realizar las siguientes etapas:

- 1. añadir directamente un volumen definido de una muestra, a saber, sangre entera o plasma sanguíneo, en un vial que contenga la composición de reactivos; la medición debe comenzar en un momento cercano al momento de añadir la muestra
- 55 2. después de disolver la mezcla de reactivos en la muestra (5 seg.), la mezcla de muestra y reactivo se pipetea desde el vial de reactivo en el vaso de medición 2 (no es necesario si el vial funciona como vaso de medición 2)
- 3. el vaso 2 se coloca a continuación en una posición tal que el pasador 3 se sumerge en el líquido contenido en el vaso de ensayo, la medición continúa hasta que el usuario la detiene

60 **[0076]** Por lo tanto, el usuario no necesita más de 4 etapas de pipeteo en total para realizar cada ensayo (en comparación con las hasta 8 etapas requeridas para un sistema de reactivo líquido) y no es necesario cambiar la punta de la pipeta al preparar un ensayo. Esto indica claramente el beneficio directo de la presente invención para la persona que está realizando dichos ensayos.

65

[0077] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de diagnóstico o un recipiente 1 según la reivindicación 14 en un procedimiento para analizar el comportamiento viscoelástico de un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo.

5 **[0078]** Aunque la presente invención se ha descrito según realizaciones preferidas, es obvio para un experto en la materia que modificaciones son posibles en todas las realizaciones.
Signos de referencia

[0079]

- | | | |
|----|---|---------------------------|
| 10 | 1 | contenedor |
| | 2 | vaso de medición |
| | 3 | pasador |
| | 4 | aparato de medición |
| 15 | 5 | tapa |
| | 6 | cámaras de reactivo a,b,c |

REIVINDICACIONES

1. Una composición de diagnóstico para su uso en el análisis viscoelástico de un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo, que comprende:

- a) al menos un activador de la coagulación que se selecciona de factor tisular (TF);
- b) una sal de calcio, preferentemente CaCl_2 , en una cantidad suficiente para asegurar la recalcificación del líquido de ensayo; y,
- c) uno o más inhibidores de heparina, plaquetas o fibrinólisis;

caracterizado porque

los componentes están presentes en una forma sustancialmente seca y en una cantidad suficiente para realizar un único análisis viscoelástico de un líquido de ensayo especificado, y donde los constituyentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino en forma separada espacialmente, donde se incluye cada uno de los constituyentes en gránulos separados espacialmente.

2. La composición según la reivindicación 1, donde la separación espacial de los constituyentes se realiza mediante la inclusión de cada constituyente en un material portador separado, en el que el material portador comprende preferentemente al menos un carbohidrato, por ejemplo, sacarosa, lactosa o celulosa.

3. La composición según la reivindicación 2, donde el material portador no muestra influencia significativa en el comportamiento de coagulación, el comportamiento de formación de coágulos o el comportamiento de lisis de coágulos.

4. La composición de diagnóstico de la reivindicación 1, donde el factor tisular se selecciona de entre TF lipídado o rTF.

5. La composición de diagnóstico de la reivindicación 1, donde el inhibidor plaquetario es un inhibidor del citoesqueleto o un antagonista de la GPIIb/IIIa, por ejemplo, citocalasina D, o donde el inhibidor de fibrinólisis se selecciona de entre aprotinina, ácido tranexámico o ácido épsilon-aminocaproico (EACA), o donde el inhibidor de heparina se selecciona de entre heparinasa, protamina o péptidos relacionados con la protamina.

6. La composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones anteriores, donde el factor de coagulación adicional se selecciona de entre uno o más factores de coagulación o factores de coagulación activados, preferentemente FXa o FVa o proteína C activada o FVIIa, o donde CaCl_2 está presente en una cantidad de alrededor de 1-100 mmol/ml del líquido de ensayo, preferentemente la muestra de sangre, o donde la forma seca es una forma liofilizada.

7. La composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un estabilizador, o donde el estabilizador es albúmina o gelatina.

8. La composición de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además uno o más fosfolípidos seleccionados de entre fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidiletanolcolina y mezclas de fosfolípidos extraídos del cerebro de conejo.

9. Un recipiente, que comprende la composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones 1-8.

10. El recipiente de la reivindicación 9, donde el recipiente (1) adopta la forma de un vial o una cubeta, y preferentemente está formado de manera que el perfil lateral interno se reduce desde la abertura hasta la parte inferior.

11. El recipiente de la reivindicación 9 o 10 con su parte interna conformada de manera que pueda unirse a un dispositivo para realizar mediciones viscoelásticas, y preferentemente consiste en al menos dos materiales diferentes, donde un material que forma básicamente o al menos parcialmente la forma externa del recipiente permite el sellado hermético del recipiente mediante una cubierta adecuada, mientras que el otro material que básicamente cubre la parte que concibe el líquido de ensayo permite la adhesión adecuada de sangre o componentes sanguíneos sin activar la cascada de coagulación.

12. Un procedimiento para realizar un análisis viscoelástico en un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo;
- b) proporcionar un recipiente (1) según una de las reivindicaciones 9-11;
- c) añadir el líquido de ensayo en dicho recipiente (1), disolviendo así la composición de diagnóstico contenida en el mismo;
- d) transferir opcionalmente la mezcla de dicho líquido de ensayo y dicha composición de diagnóstico a un aparato

(4) adecuado para realizar un análisis viscoelástico;

o

colocar el recipiente 1 en un aparato 4 adecuado para realizar un análisis viscoelástico; y

e) realizar el análisis viscoelástico de dicha mezcla.

5

13. El procedimiento de la reivindicación 12, donde el líquido de ensayo preferentemente es de mamífero, más preferentemente una muestra de sangre humana, y/o

10 donde la etapa c) toma alrededor de 1-60 s, preferentemente alrededor de 2-10 s, más preferentemente alrededor de 5 s, y/o

donde la mezcla se transfiere en la etapa d) pipeteando manual o automáticamente la mezcla desde el recipiente (1) y transfiriéndola de este modo al aparato (4), y/o

donde la mezcla se transfiere al vaso de medición (2) del aparato (4), y/o

donde el aparato (4) es un tromboelastómetro o un trombelastógrafo, y/o

15 donde el análisis comprende la determinación del tiempo de coagulación, el tiempo de formación del coágulo, la firmeza del coágulo a lo largo del tiempo y/o fibrinólisis.

14. El uso de una composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones 1-8 o de un recipiente

(1) de una o más de las reivindicaciones 9-11 en un procedimiento para analizar el comportamiento viscoelástico de

20 un líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo, donde preferentemente al menos dos composiciones de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones 1-8 o al menos dos recipientes (1) de una o más de las reivindicaciones 9-11 se utilizan en un procedimiento combinado para analizar el comportamiento viscoelástico del mismo líquido de ensayo seleccionado de entre sangre entera o plasma sanguíneo.

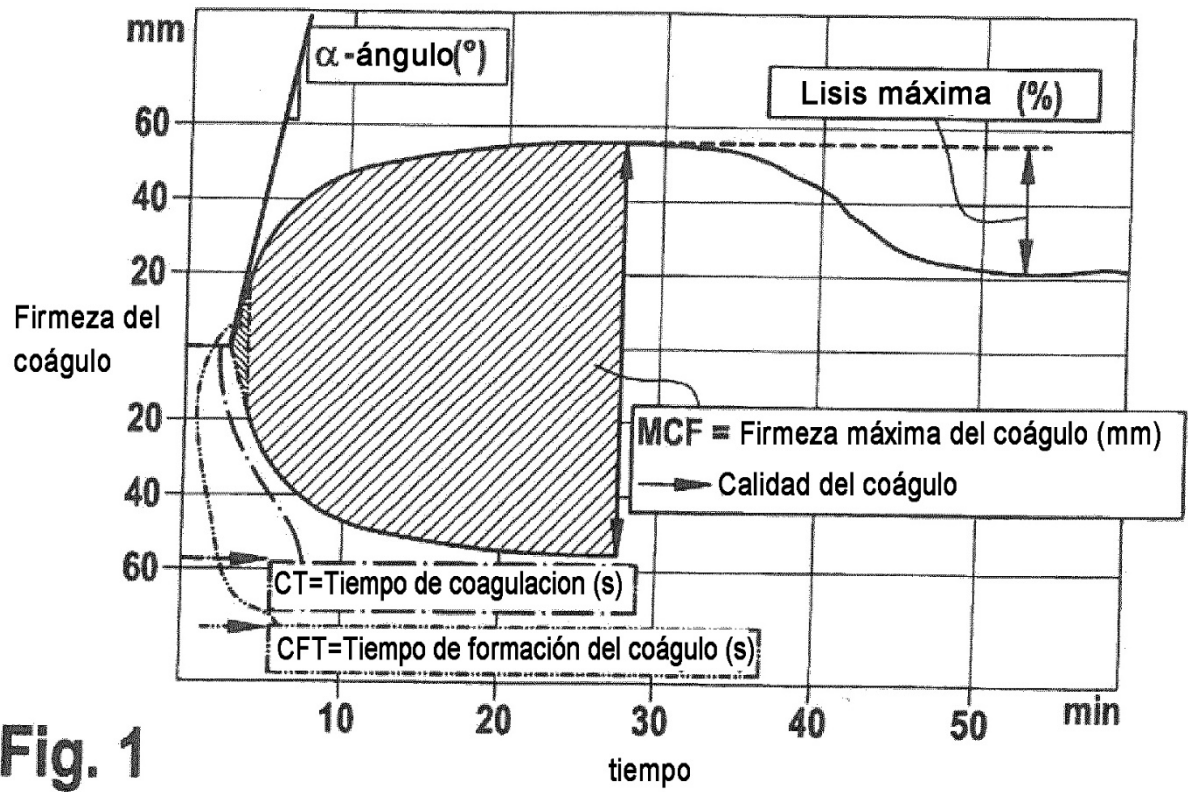


Fig. 1

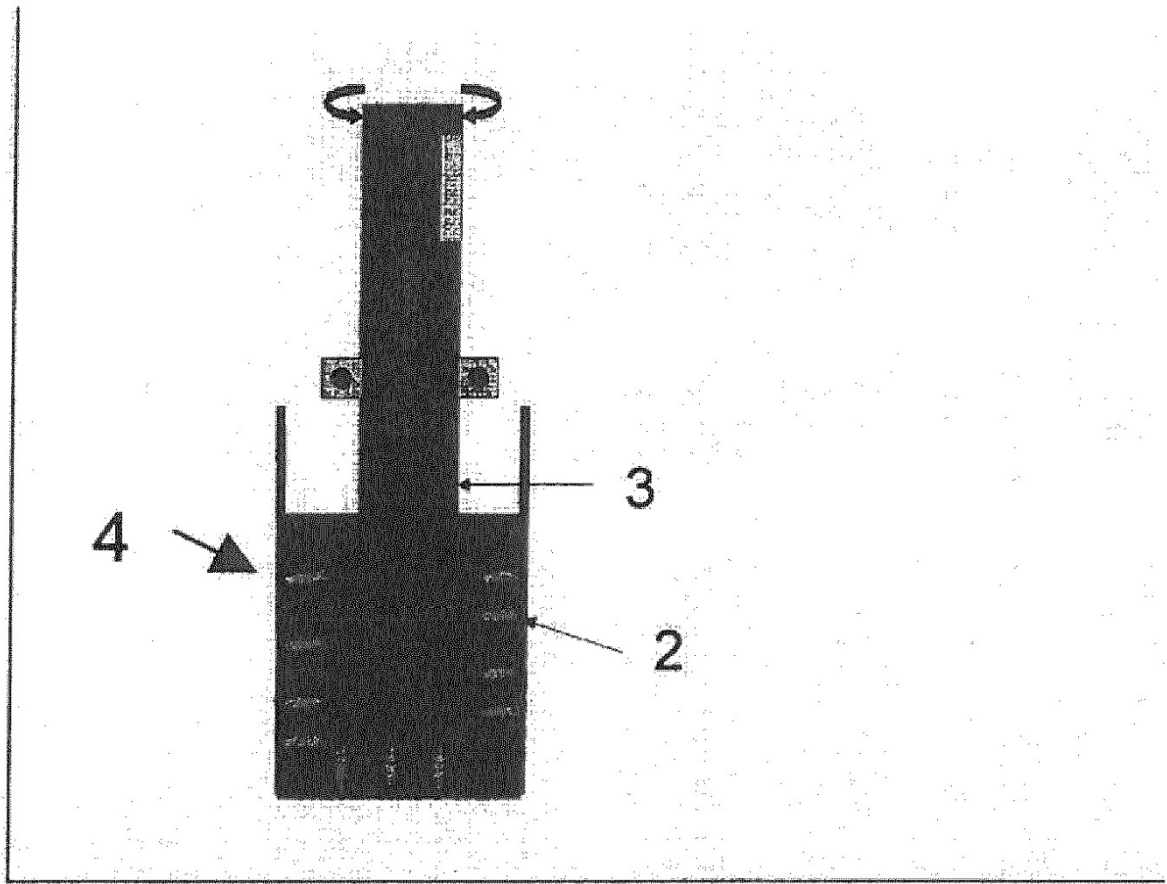


Fig. 2

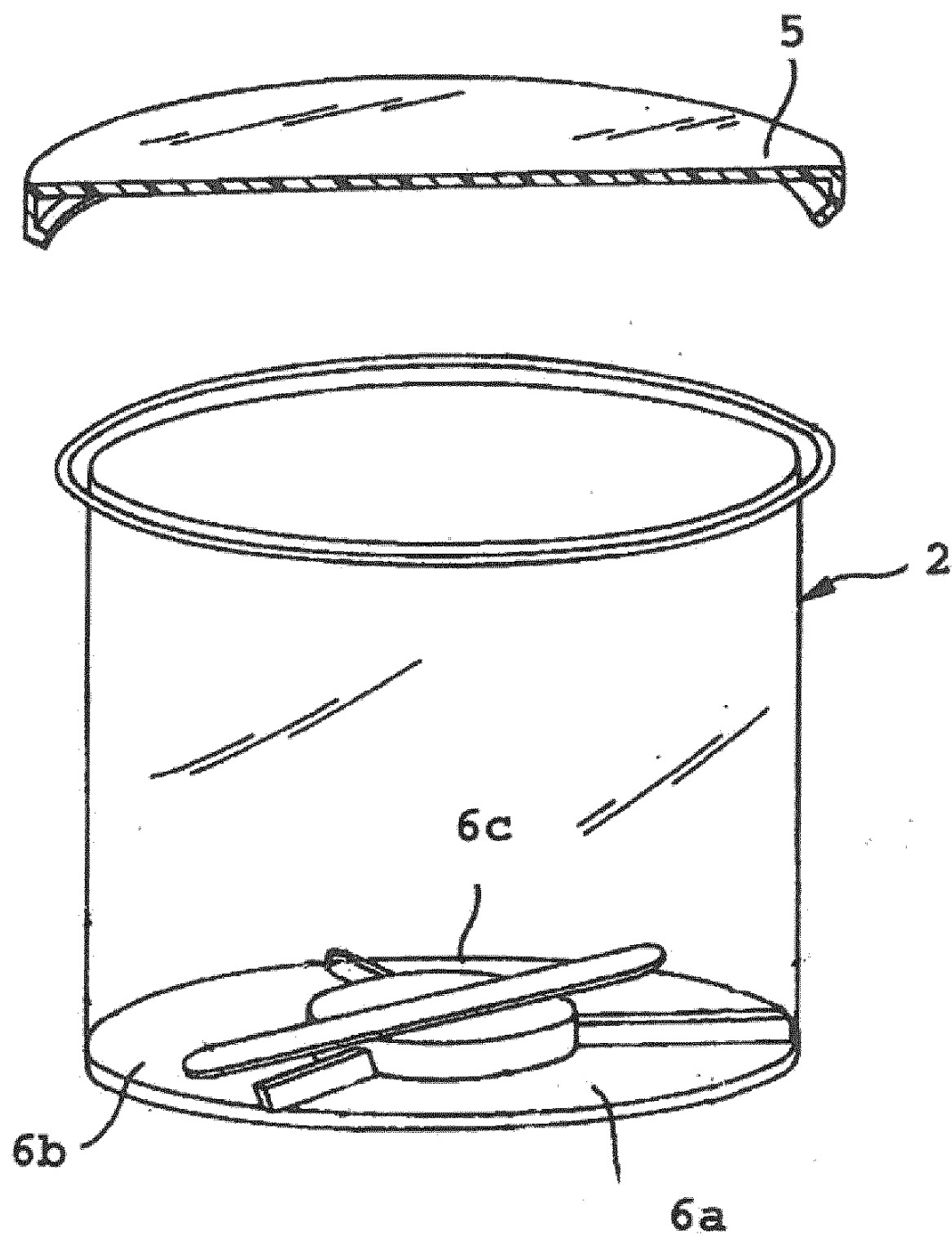


Fig. 3

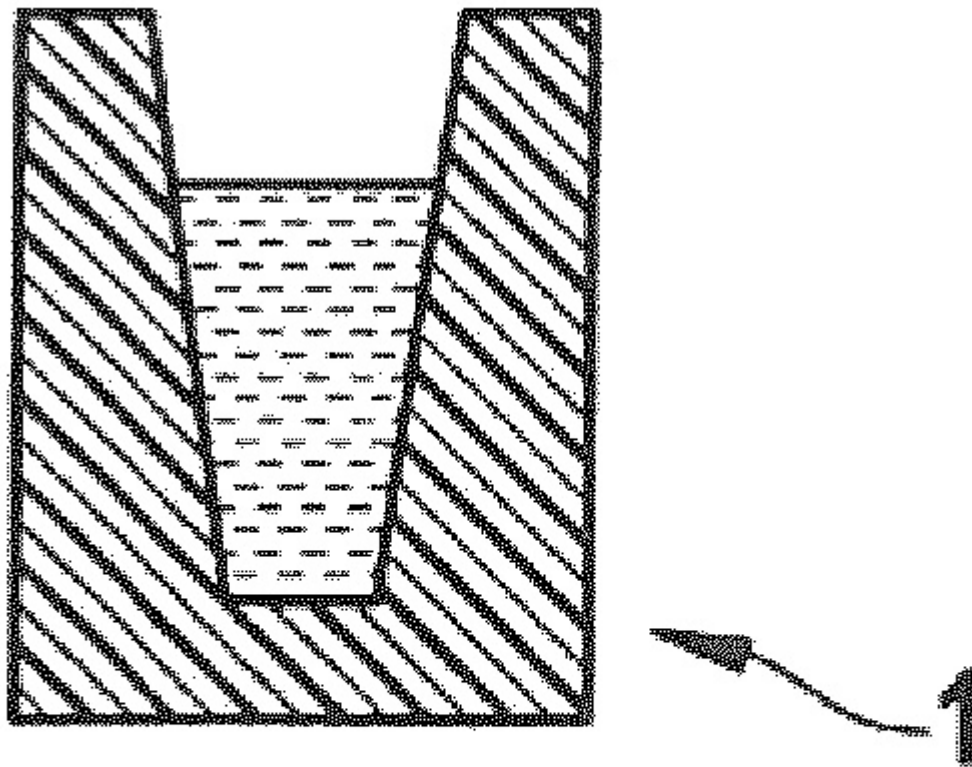


Fig. 4A

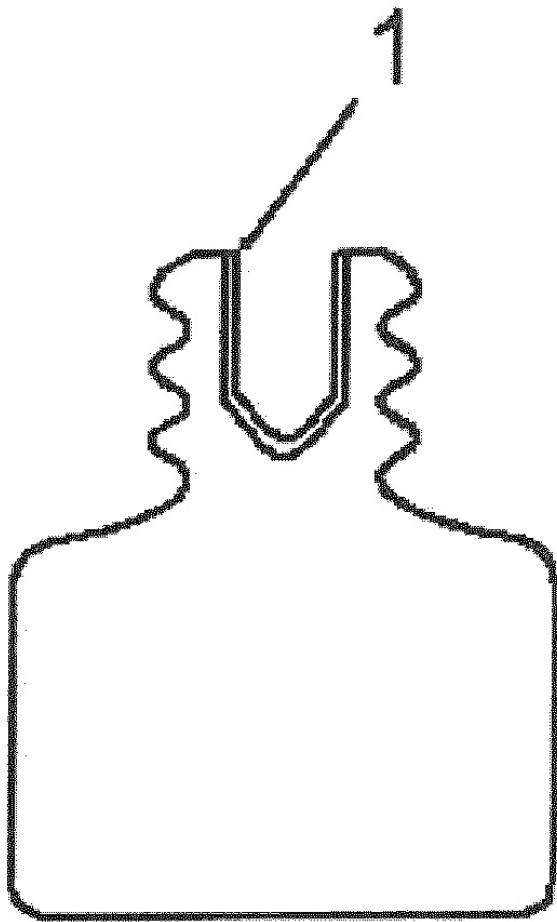


Fig. 4B

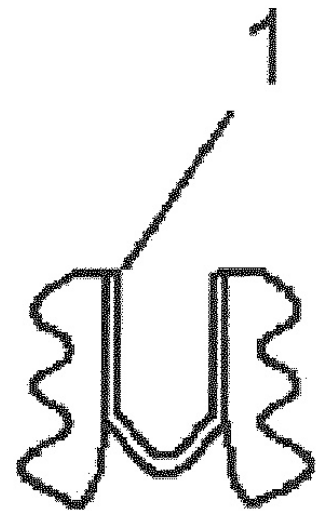


Fig. 4C