

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 355**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2002 E 02763220 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1409713**

54 Título: **Ensayo para medir los complejos de factor VIIa-antitrombina**

30 Prioridad:

03.07.2001 US 302867 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2013

73 Titular/es:

**OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
825 N.E. 13TH STREET
OKLAHOMA CITY, OK 73104, US**

72 Inventor/es:

MORRISSEY, JAMES, H.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 407 355 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

Ensayo para medir los complejos de factor VIIa-antitrombina.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a ensayos *in vitro* de trastornos de la coagulación de la sangre.

Antecedentes

10 Se han diseñado varios ensayos clínicos para medir el grado de reemplazo del sistema de coagulación de la sangre. Estos ensayos se utilizan de forma rutinaria para evaluar la severidad de coagulopatías como la coagulación intravascular diseminada (CID). Muchos de estos ensayos también se están estudiando por su utilidad para la predicción de estados hipercoagulables que pueden predisponer a una persona a desarrollar trombosis venosa profunda (TVP), ataques de corazón, apoplejía isquémica, u otros trastornos trombóticos o tromboembólicos. Los ejemplos de estos ensayos son las mediciones de los niveles plasmáticos del fibrinopéptido A, los complejos trombina-antitrombina, el fragmento de protrombina 1+2, los dímeros-D, y el factor VIIa (Amiral, J and Fareed, J. (1966). "Thromboembolic diseases: biochemical mechanisms and new possibilities of biological diagnosis", *Semin Thromb Hemost* 22 Suppl, 1:41-48; Gouin-Thibault, I. and Samana, M.M. 1999. "Laboratory diagnosis of the thrombophilic state in cancer patients", *Semin Thromb Hemost* 25: 167-172; Morrissey, J. H. et al. 1993. "Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation", *Blood* 81: 734-744; and Morrissey, J. H. 1996. "Plasma factor VIIa: Measurement and potential clinical significance", *Haemostasis* 26: 66-71. Estos ensayos permiten conocer *in vivo* el grado de la activación en curso del sistema de coagulación de la sangre. Por ejemplo, los niveles de fibrinopéptido A y dímero D reflejan el grado en el que el fibrinógeno se convierte en fibrina. Los niveles de complejos trombina-antitrombina y del fragmento de protrombina 1+2 reflejan *in vivo* el grado en el que la protrombina se convierte en trombina. No se pueden medir los niveles de actividad de la trombina en plasma directamente porque la enzima activa presenta una vida media en plasma muy corta (debido al elevado contenido en plasma de los inhibidores de la proteasa). Por consiguiente, los niveles de los complejos trombina-antitrombina reflejan la tasa en curso de la activación de trombina *in vivo* ya que la antitrombina (conocida anteriormente como antitrombina III ó ATIII) es un importante inhibidor de la trombina en plasma, y porque estos complejos presentan una vida media mucho más elevada que la trombina. Asimismo, el fragmento de protrombina 1+2 se libera a partir de la protrombina cuando se activa por la trombina, y estos fragmentos pueden circular en plasma a niveles mensurables. Por estas razones, se piensa que las mediciones tanto de complejos trombina-antitrombina como del fragmento de protrombina 1+2 en plasma reflejan la tasa en curso de la generación de trombina *in vivo*.

Además de estos ensayos específicos sobre la activación de la trombina, también se han desarrollado ensayos para medir los marcadores plasmáticos de otros factores de la coagulación de la sangre. En el caso de los factores IX y X, así como con la trombina, las proteasas activas (factores IXa y Xa) presentan una vida media en plasma muy corta y por consiguiente no es posible medir sus niveles directamente. Sin embargo, como con la protrombina, los ensayos se han desarrollado para evaluar el grado de activación de los factores IX y X. Un grupo de procedimientos implica la medición de los niveles plasmáticos de los péptidos de activación liberados por los factores IX, X cuando se convierten en factores IXa y Xa. Estos péptidos de activación circulan con una vida media más larga que las proteasas activadas en sí mismas, y los ensayos basados en la medición de los niveles de estos péptidos de activación se han desarrollado y se han aplicado en varios estudios epidemiológicos (Bauer, K.A. 1994, "New markers for *in vivo* coagulation", *Curr Opin Hematol* 1:341-346; Bauer K. A. 1999. "Activation markers of coagulation", *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12: 387-406; and Cooper, J. A. et al. 2000. "Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk factors for prediction of coronary heart disease", *Circulation* 102: 2816-2822).

Otra forma de evaluar la tasa en curso de la activación de los factores IX o X es mediante la medición de los niveles de complejos de circulación del factor IXa o del factor Xa con sus inhibidores plasmáticos. Esto se ha hecho con los complejos factor IXa-antitrombina (Takahashi, et al. 1991 "Activated factor IX-anthithrombin III complexes in human blood: quantification by an enzyme-linked differential antibody immunoassay and determination of the *in vivo* half-life", *J Lab Clin Med* 118: 317-325) y con los complejos factor Xa-antitrombina (Gouin-Thibault, I. et al. 1995. "Measurement of factor Xa-antithrombin III in plasma: relationship of prothrombin activation *in vivo*", *Br J Haematol* 90: 669-680; Bauer, K. A. 1994. "New markers for *in vivo* coagulation", *Curr Opin Hematol* 1: 341-346; y Bauer, K. A. 1999. "Activation markers of coagulation", *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12: 387-406). Además, también se ha desarrollado ensayos para medir los niveles de circulación de complejos entre el factor Xa y el inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) (Okugawa, Y. et al. 2000. "Increased plasma levels of of tissue factor pathway inhibitor-activated factor X complex in patients with disseminated intravascular coagulation", *Am J Hematol* 65: 210-214; Iversen, N. et al. 2000. "Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in disseminated intravascular coagulation: low levels of the activated factor X-TFPI complex", *Blood Coagul Fibrinolysis* 11: 591-598; Iversen, N. et al. 2000. "Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in disseminated intravascular coagulation: low levels of the activated factor X-TFPI complex", *Blood Coagul Fibrinolysis* 11: 591-598; y Miller, G. J. 2000. "Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph", *Thromb Haemost* 83: 427-432).

El factor de coagulación VII se convierte en la forma activada, factor VIIa, mediante la proteólisis de la unión de un solo péptido (Morrissey, J. H. 2001. "Tissue factor and factor VII initiation of coagulation", *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, R. W. Colman et al. eds., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 89-101). Por esta razón no es posible monitorizar la activación del factor VII utilizando un ensayo de activación del péptido, como se ha hecho con la protrombina o los factores IX o X. Sin embargo, el factor VIIa presenta una vida media relativamente elevada (aproximadamente 2 horas), y por lo tanto ha sido posible desarrollar un ensayo de coagulación (basándose en una forma mutada del factor tisular) que puede medir específicamente los niveles del factor activo VIIa en plasma (Morrissey, J. H. et al. 1993. "Quantitation of activated factor VIIa in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation", *Blood* 81: 734-744).

La medición de los niveles plasmáticos del factor VIIa es de interés porque el sistema de coagulación de la sangre se inicia cuando el factor VII o VIIa se une al factor tisular (una proteína de membrana integral) en las superficies celulares. El complejo de unión de membrana resultante del factor VIIa y el factor tisular es el iniciador de la coagulación de la sangre más potente que se conoce. El factor tisular está presente normalmente sólo en células fuera del sistema vascular, y desencadena la coagulación sanguínea en una hemostasia normal que sigue a una lesión vascular, lo que permite de esta forma que la sangre entre en contacto con el factor tisular. La expresión del factor tisular se puede inducir en células monocíticas y endoteliales mediante mediadores de la inflamación. Se cree que la expresión inducida del factor tisular es la responsable de la activación patológica de la coagulación sanguínea que desencadenan varios trastornos trombóticos (Morrissey, J. H. 2001. "Tissue factor and factor VII initiation of coagulation", in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, R. W. Colman et al. eds., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 89-101).

El factor VIIa presenta una vida media plasmática elevada porque es esencialmente no reactivo frente los otros inhibidores de la proteasa en el plasma en ausencia de su cofactor, el factor tisular (Morrissey, J. H. 2001. "Tissue factor and factor VII initiation of coagulation", in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, R. W. Colman et al. eds., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 89-101). Sin embargo, cuando el factor VIIa se une al factor tisular, resulta susceptible a la inhibición por parte tanto de la antitrombina como de la TFPI. Curiosamente, cuando el factor VIIa unido al factor tisular reacciona con la antitrombina, los complejos de factor VIIa-antitrombina (factor VIIa-AT) resultantes pierden afinidad por el factor tisular. Por consiguiente, estos complejos, una vez formados, se liberan en la solución (Hamamoto, T. and Kisiel, W. 1998. "The effect of cell surface glycosaminoglycans (GAGS) on the activation of factor VIIa-Tissue factor activity by antithrombin II", *Int J Hematol* 68: 67-78; Kondo, S. and Kisiel, W. 1987. "Regulation of factor VIIa in plasma: evidence that antithrombin III is the sole plasma proteinase inhibitor of human factor VIIa", *Thromb Res* 46: 325; Lawson, J. H. et al. 1993. "Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin", *J Biol Chem* 268: 767-770; and Rao, L. V. M. et al. 1993. "Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor VIIa", *Blood* 81: 2600-2607).

Debido a que el factor VIIa sólo es susceptible de inhibición por parte de la antitrombina cuando está unido al factor tisular, y debido a que los complejos de factor VIIa-AT resultantes se liberan desde el factor tisular, los niveles circulantes del factor VIIa-AT reflejan el grado de exposición del factor tisular en la sangre. Se espera que esta exposición intravascular del factor tisular sea el resultado de estados inflamatorios y de hecho se ha demostrado previamente que impulsa la coagulopatía mortal asociada a sepsis (De Boer, J. P et al. 1993. "Activation patterns of coagulation and fibrinolysis in baboons following infusion with lethal or sublethal dose of *Escherichia coli*", *Circ Shock* 39: 59-67; Drake, T. A. et al. 1993. "Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis", *Am J Pathol* 142: 1458-1470b; y Taylor, F. B. et al. 1991. "Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody", *Circ Shock* 33: 127-134). Además, la exposición intravascular en curso del factor tisular, debida posiblemente a unas patologías inflamatorias crónicas, puede contribuir a estados hipercoagulables que podrían conducir al desarrollo de enfermedades trombóticas. Por estas razones, sería importante ser capaz de valorar el nivel de la exposición intravascular del factor tisular.

Se ha descubierto recientemente que existen niveles medibles de complejos de factor VIIa-AT en plasma y que se pueden utilizar para valorar el nivel de la exposición intravascular del factor tisular. Se ha desarrollado un ensayo ELISA para medir los niveles plasmáticos de los complejos de factor VIIa-AT en plasma. También se dan a conocer los anticuerpos que se utilizan en el ELISA y los procedimientos utilizados en el ensayo para evaluar a pacientes de riesgo o monitorizar la terapia anticoagulante.

Kondo et al., *Thrombosis research*, Vol. 46: 325-335 (1987) da a conocer un procedimiento para la detección del complejo de factor VIIa-antitrombina obtenido mediante la incubación de factor VIIa y antitrombina incubados, que comprende la realización de dos transferencias Western, una de ellas con anticuerpos de anti-factor VIIa y la otra con IgG anti-antitrombina.

La patente US nº 5.843.442 da a conocer anticuerpos capaces de unir el factor VII y el factor VIIa y el factor tisular/complejo de factor VII en ausencia de calcio para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una curva estándar típica del factor VIIa-AT ELISA, que utiliza los procedimientos del ejemplo 1.

La figura 2 es un histograma de la distribución de los niveles plasmáticos del factor VIIa-AT de 100 voluntarios normales.

La figura 3 representa la relación entre los niveles plasmáticos del factor VIIa activo y los complejos de factor VIIa-AT.

La figura 4 representa los complejos de factor VIIa-AT medidos en el plasma de voluntarios normales tratados con niveles bajos de endotoxinas bacterianas (LPS). Estas muestras de sangre eran las del estudio sobre la infusión de endotoxinas publicado por Taylor et al. (Taylor, F. B. et al. 2001. "Two-stage response to endotoxin infusion into normal human subjects: Correlation of blood phagocyte luminiscence with clinical and laboratory markers of the inflammatory, hemostatic response", *Crit Care Med* 29: 326-334).

La figura 5 representa una curva estándar típica del ensayo ELISA según los procedimientos del ejemplo 2.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la medición de la concentración de los complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de un paciente que comprende

La mezcla de una cantidad de dicha muestra plasmática con una captura primaria de anticuerpo unida a una fase sólida, y que dicha captura del anticuerpo se caracteriza por su capacidad de unirse

- a) a la parte de factor VIIa o
- b) a la porción de antitrombina

de los complejos de factor VIIa-antitrombina que pueden estar presentes en la muestra plasmática, y la incubación de dicha mezcla bajo unas condiciones que impulsen la unión entre dicho anticuerpo de captura y dichos complejos de factor VIIa-antitrombina que pueden estar presentes en dicha muestra plasmática para formar complejos de factor VIIa-antitrombina unidos y una mezcla no unida;

extracción de dicha mezcla no unida;

mezcla de dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos con un anticuerpo secundario que se caracteriza por su capacidad de unirse

- a) a la porción de antitrombina o
- b) a la porción del factor VIIa, respectivamente

de dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos para formar unos complejos de factor VIIa-antitrombina-anticuerpo secundario unidos y una mezcla de anticuerpo secundario no unido;

extracción de todas las mezclas de anticuerpo secundario no unido;

determinación de la cantidad de anticuerpo secundario no unido; y

comparación de la cantidad de anticuerpo secundario unido con las cantidades estándares de anticuerpo secundario no unido determinados por los complejos de factor VIIa-antitrombina unidos de una concentración conocida.

Descripción detallada

La exposición intravascular en curso del factor tisular como resultado de una lesión vascular o de una patología inflamatoria crónica puede contribuir a estados hipercoagulables que conducen sistemáticamente al desarrollo de una enfermedad trombótica. Según la presente invención, una valoración del diagnóstico del riesgo de un paciente de entrar en un estado hipercoagulable se puede realizar mediante la medición de la cantidad de complejos de factor VIIa-AT en el plasma del paciente, y el nivel de los complejos de factor VIIa-AT se considera que refleja el grado de exposición intravascular del factor tisular. Mediante la monitorización del paciente durante un periodo de tiempo, un aumento o una disminución del nivel de los complejos circulantes de factor VIIa-AT en el paciente se puede utilizar para indicar un aumento o una disminución del riesgo de entrar en un estado hipercoagulable, respectivamente.

Según la presente invención, los niveles medibles de complejos circulantes de factor VIIa-AT se pueden detectar en el plasma del paciente. La cantidad de complejos de factor VIIa-AT en el plasma del paciente se pueden medir

mediante inmunoensayos *in vitro*. En estos inmunoensayos, se pueden utilizar anticuerpos en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida para detectar la presencia de los complejos de factor VIIa-AT. Los anticuerpos contra los complejos de factor VIIa-AT se pueden marcar utilizando varios marcadores y procedimientos de marcado conocidos en la técnica, que incluyen pero no limitan a los marcadores enzimáticos, marcadores radiosiotópicos, marcadores no radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de toxinas y marcadores quimioluminiscentes. La unión de estos marcadores a los anticuerpos se puede conseguir utilizando procedimientos conocidas en la técnica (Harlow, E. and Lane, D.1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Col Spring Harbor Laboratories, New York, pp. 319-358). Se pueden utilizar procedimientos de radioinmunoensayos competitivos para medir los complejos de factor VIIa-AT mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Un procedimiento preferido para medir los complejos de factor VIIa-AT es el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales capaces de detectar los complejos de factor VIIa-AT se pueden utilizar en un ensayo inmunométrico como un ensayo de dos sitios o sándwich. En un ensayo sándwich habitual, se une una cantidad de un antígeno no marcado a un soporte sólido mediante un anticuerpo en fase sólida y se añade una cantidad anticuerpo soluble marcado detectable para permitir la detección y/o cuantificación del complejo formado entre el anticuerpo en fase sólida, el antígeno, y el anticuerpo marcado. (*Current Protocols in Immunology: Indirect Antibody-Sandwich ELISA to Detect Soluble Antigens*. John Wiley and Sons, New York, NY; 1991; pp. 2.0.1-2.1.18). También se contempla la utilización de una prueba ELISA inversa, es decir, las placas se pueden recubrir con anticuerpos contra la antitrombina y complejos de factor VIIa-AT y detectarlos con anticuerpos de factor VII/VIIa.

Según la presente invención, los complejos de factor VIIa-AT en el plasma de un paciente se miden preferentemente utilizando una prueba ELISA sándwich como se indica en el ejemplo 1 o en el ejemplo 2. En el ensayo sándwich, se utiliza un anticuerpo de captura primario como el anticuerpo en fase sólida. En una forma de realización preferida, los anticuerpos monoclonales o policlonales, especialmente purificados por afinidad para seleccionar anticuerpos para el antígeno diana, para su utilización como un anticuerpo de captura primario en el procedimiento de la presente invención frente al factor VII o VIIa que utilizan los procedimientos habituales. Se pueden utilizar anticuerpos policlonales purificados por afinidad para VII/VIIa o anticuerpos monoclonales. Se selecciona un anticuerpo adecuado comprobando si presenta las propiedades necesarias para funcionar en el procedimiento de la invención, incluyendo el procedimiento del factor VIIa-AT ELISA. El anticuerpo seleccionado como anticuerpo de captura primario no sólo ha de presentar especificidad para el antígeno diana y una afinidad adecuada, también ha de presentar una unión independiente del calcio (la capacidad de unirse al factor VII/VIIa (incluso en ausencia de iones de calcio) y la capacidad de unirse al factor VIIa (incluso cuando se presenta en un complejo con la antitrombina)). Estas propiedades se pueden determinar mediante la utilización de los procedimientos de pruebas descritos en el presente documento. Cabe destacar que como el factor VII/VIIa se une a muchos iones de calcio, muchos anticuerpos frente a VII/VIIa se unirán a este antígeno sólo en presencia de iones de calcio. Además, una gran parte de anticuerpos en contra tanto del factor VII como del factor VIIa se unirán equitativamente bien a ambos factores VII o VIIa.

Las uniones independientes del calcio se pueden determinar de la siguiente forma. Los anticuerpos monoclonales se criban por reactividad con el factor VII o VIIa utilizando procedimientos habituales como ELISA, radioinmunoensayo (RIA) u otra técnica adecuada. Sea cual sea el procedimiento que se utilice, el cribado para la unión del anticuerpo al factor VII se ha de realizar en presencia de un agente quelante de calcio como EDTA o EGTA (10 mM son normalmente suficientes), para asegurar que el anticuerpo se une al factor VII/VIIa en ausencia de iones de calcio. Sólo son considerados los anticuerpos cuyas uniones no disminuyen en presencia de EDTA.

La capacidad de unión en presencia de la antitrombina se puede determinar de la siguiente forma. Se preparan los complejos de factor VII-antitrombina (VIIa-AT) tal como se describen en la presente memoria. Los anticuerpos anti-VII/VIIa candidatos se recubren en placas de microtitulación tal como se describe en los ejemplos 1 y 2. La reactividad con el factor VIIa/AT se detecta utilizando anticuerpos de la antitrombina. Los anticuerpos del factor VII/VIIa cuyo epítipo se bloquea cuando la antitrombina se une a VIIa no conseguirán unirse a los complejos VIIa-AT y por consiguiente no podrán proporcionar una señal positiva en este ensayo ELISA. Una señal positiva es un aumento de la señal por encima del fondo. El ruido de fondo se determina utilizando un anticuerpo control irrelevante unido a las placas.

Los anticuerpos frente la AT están comercializados en numerosas fuentes y se puede seleccionar uno adecuado mediante una prueba similar a la proporcionada anteriormente para la unión a los complejos de factor VIIa-AT, excepto que los anticuerpos frente al factor VIIa/VII se utilizan para probar si el epítipo de la antitrombina se bloquea y no puede después unirse a complejos VIIa-AT. Tal como se muestra en el ejemplo 1, un ejemplo de anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal murino IgG1 frente al factor humano VII designado como Anticuerpo #1172 (células de hibridoma depositadas en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA bajo designación del depositante #1172 y otorgado No. PTA-3497 en la ATCC), que se une al factor VII o VIIa de una forma independiente del calcio, y porque su epítipo no se bloquea cuando el factor VIIa reacciona con la antitrombina, el Anticuerpo #1172 también reconoce los complejos de factor VIIa-AT. El anticuerpo de captura primario también puede ser un anticuerpo capaz de reconocer la porción AT del complejo de factor VIIa-AT, siempre y cuando su epítipo no está bloqueado cuando el factor VIIa reacciona con la antitrombina para formar los complejos de factor VIIa-AT. Existe la posibilidad de que se puedan realizar cambios en el anticuerpo de captura

primario y que se conserve la función en el ensayo. Por ejemplo, los fragmentos Fab o Fab'₂ se pueden preparar utilizando procedimientos conocidos y estos fragmentos se pueden utilizar en el ensayo.

5 El anticuerpo de captura primario se recubre en un contenedor de ensayos adecuado como una placa de poliestireno de 96 pocillos. También se podrían utilizar procedimientos alternativos de inmovilización como el biotilado del anticuerpo y su captura en placas utilizando avidina o estreptavidina inmovilizada. Cuando el sándwich se invierte, también se podría detectar la unión biotilada #1172 utilizando una avidina o estreptavidina adecuadamente marcada. La placa se puede, si se desea, bloquear frente a uniones no específicas mediante uno de los procedimientos aceptados conocidos en la técnica, preferentemente utilizando leche desnatada, y limpiándola después con un tampón adecuado para extraer los anticuerpos de captura no unidos. En el ejemplo 1 se proporciona un ejemplo de utilización de la técnica de bloqueo, y en el ejemplo 2 se proporciona un ejemplo sin la técnica de bloqueo.

15 Según el ensayo de la presente invención, la cantidad de complejos de factor VIIa-AT tanto en el plasma de un paciente como en otras preparaciones se cuantifica en comparación con una curva estándar preparada mediante el ensayo simultáneo de concentraciones conocidas de complejos de factor VIIa-AT. Para preparar una muestra del paciente, se extrae una pequeña cantidad de sangre mediante venopunción utilizando las técnicas hematológicas habituales en un anticoagulante, a partir del cual se prepara el plasma mediante centrifugación. Se puede evitar la coagulación del plasma del paciente utilizando citrato, EDTA, u otro agente quelante de calcio. Posteriormente, el plasma pobre en plaquetas resultante se diluye preferentemente mediante diluciones seriadas de 10 a 40 veces, más preferentemente de 20 a 40 veces, con un tampón adecuado y se añaden alícuotas de cada dilución a los pocillos de las placas para proporcionar un intervalo de concentraciones finales.

25 Para preparar la curva estándar, se generan preferentemente *in vitro* unas concentraciones conocidas de complejos de factor VIIa-AT utilizando proteínas purificadas. Los intervalos de las concentraciones finales ejemplificativos son 0, 20, 40, 60, 80 y 100 pM por pocillo; más preferentemente 0,8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 pM por pocillo. Los ejemplos 1 y 2 proporcionan ejemplos de los procedimientos para la obtención de los complejos de factor VIIa-AT *in vitro*. Generalmente, el factor VIIa (50-100 nM, preferentemente 100 nM) se combina con el factor tisular (100-150 nM, preferentemente 150 nM en términos de factor tisular soluble recombinante) para formar complejos de factor VIIa-factor tisular que se hacen reaccionar después con antitrombina (100-750 nM, preferentemente 400 nM) y heparina para formar los complejos de factor VIIa-AT. Es necesario que las concentraciones de factor tisular y antitrombina se encuentren en exceso en comparación con la concentración de factor VIIa. El factor VIIa se puede obtener convirtiendo al factor VII aislado en factor VIIa según los procedimientos indicados en la patente US nº 5.741.658. Preferentemente, se utiliza el factor VIIa humano recombinante purificado. El factor VIIa recombinante se puede generar según uno de los procedimientos conocidos en la técnica o se puede obtener comercialmente. El factor tisular útil para generar los complejos de factor VIIa-factor tisular puede ser de longitud completa o truncado, aislado o recombinante (Solicitud de patente europea nº 0278776; y Morrissey, et al., 1987. "Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for initiation of the coagulation protease cascade", *Cell* 50: 129-135), de wild-type o modificado. El factor tisular soluble se puede obtener de Diagnostica Stago, Inc., Parsipany, NJ. La antitrombina (también conocida como antitrombina III o ATIII) puede ser aislada o recombinante (Patente europea No. 0090505). Las fuentes comerciales de antitrombina III aislada a partir de plasma humano congelado, fresco y mezclado incluyen American Diagnostica, Inc., Greenwich, CT y Haematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT. En la presente invención, se puede utilizar una de las fuentes comerciales de heparina con propiedades anticoagulantes. La verificación o conversión a complejos de factor VIIa-AT se puede conseguir mediante uno de los procedimientos conocidos en la técnica. El ejemplo 2 proporciona un procedimiento de ejemplo en el se compara la actividad enzimática del factor VIIa de los complejos de factor VIIa-factor tisular y los complejos de factor VIIa-AT, con la formación de los complejos de factor VIIa-AT que se indica mediante una pérdida conveniente de la actividad enzimática del factor VIIa y la concentración de los complejos de factor VIIa-AT asociada con la concentración inicial de factor VIIa. El factor VIIa-AT estándar resultante se diluye después en serie con un tampón adecuado y se añaden alícuotas de cada dilución a los pocillos en la placa para proporcionar las concentraciones finales en el intervalo de pM.

55 Después de la incubación bajo unas condiciones que permiten la reacción entre el anticuerpo de captura primario y los complejos de factor VIIa-AT y del lavado con un tampón adecuado, la placa se trata con un anticuerpo secundario capaz de unirse tanto a la antitrombina como a la parte de factor VIIa de los complejos de factor VIIa-AT que se une a la porción opuesta del complejo de esta unión por el anticuerpo de captura (es decir, si el anticuerpo de captura se une a la parte de factor VIIa, se utiliza un segundo anticuerpo capaz de unirse a la porción de antitrombina; y si el anticuerpo de captura se une a la porción de antitrombina, se utiliza un segundo anticuerpo capaz de unirse a la parte de factor VIIa). La especificidad para los complejos de factor VIIa-AT se consigue utilizando la combinación de un anticuerpo de captura primario que se une al factor VII/VIIa o a la antitrombina y un anticuerpo secundario que se une a la porción opuesta del complejo. El anticuerpo secundario se puede marcar para la detección mediante marcadores enzimáticos, marcadores radioisotópicos, marcadores no radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de toxinas y marcadores quimioluminiscentes. Después del lavado con un tampón adecuado, la placa se examina en busca del anticuerpo secundario marcado unido, y se cuantifica la cantidad de anticuerpo secundario marcado unido en cada pocillo mediante procedimientos conocidos en la técnica para el tipo específico de marcador que se ha utilizado.

Un procedimiento preferido utiliza un anticuerpo secundario detectable mediante un ensayo de sustrato cromogénico. Un ejemplo de un anticuerpo secundario para este ensayo es un anticuerpo policlonal preparado frente a la antitrombina humana en una fuente animal para el que está disponible fácilmente un anti-IgG (por ejemplo, un anticuerpo policlonal frente a la antitrombina humana preparado en conejos). Tal como se muestra en el ejemplo 1, el anticuerpo primario #1172 capturaré múltiples formas diferentes del factor VII o VIIa, y el anticuerpo de antitrombina de conejo secundario sólo reconocerá la antitrombina, y la única antitrombina que estará presente será la antitrombina que ha reaccionado previamente con el factor VIIa. Cualquier anticuerpo que se haya evaluado previamente según los procedimientos proporcionados en la presente memoria también funcionará en el ensayo.

Después del lavado con un tampón adecuado, la placa se trata con un anticuerpo terciario que reconoce el anticuerpo secundario; por consiguiente, el anticuerpo terciario sólo se unirá a placas a las que el anticuerpo secundario se haya unido previamente. En el ensayo del sustrato cromogénico, el anticuerpo terciario se ha conjugado previamente con una enzima capaz de interactuar con un sustrato cromogénico para formar un cambio espectrofotométrico medible, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica. En el ejemplo 1, el anticuerpo terciario es un anticuerpo de mono para un IgG de conejo (preferentemente purificado para minimizar la reactividad cruzada con la gG murina) que se ha conjugado con una enzima fosfatasa alcalina. El anticuerpo de mono terciario para el IgG de conejo conjugado con la fosfatasa alcalina sólo se unirá al anticuerpo secundario de anti-antitrombina de conejo unido previamente en la placa.

Después de un lavado final con un tampón adecuado, las placas se tratan con el sustrato cromogénico adecuado, y la enzima con la que se había conjugado para el anticuerpo terciario, si está presente, reaccionará con el sustrato cromogénico para formar un cambio espectrofotométrico medible que es proporcional a la cantidad de sustrato convertido por la enzima disponible. El cambio espectrofotométrico en cada pocillo se mide visualmente o mediante uno de los dispositivos de lectura espectrofotométrica conocidos en la técnica. En el ejemplo 1, las placas se tratan con sustrato *p*-nitrofenilfosfatasa (*p*-NPP) fosfatasa alcalina en un tampón adecuado. La absorbancia de luz a una longitud de onda de 405 nm se mide después utilizando un lector de microplacas.

Utilizando los resultados tanto del anticuerpo secundario marcado como del ensayo de sustrato cromogénico, se prepara una curva estándar utilizando las series de factor VIIa-AT estándares, y los niveles de los complejos de factor VIIa-AT en el plasma del paciente se miden a partir de su valor marcado en referencia a la curva estándar. En la figura 1 se proporciona un ejemplo de una curva estándar generada según el procedimiento en el ejemplo 1 para los complejos de factor VIIa-AT, y en la figura 5 se proporciona un ejemplo de una curva estándar generada según el procedimiento en el ejemplo 2. Los experimentos control han demostrado que el procedimiento de ELISA presentado en el ejemplo 1 es específico para los complejos de factor VIIa-AT, ya que los complejos de factor Xa y antitrombina no consiguieron proporcionar una señal con esta prueba ELISA.

Tal como se ha indicado anteriormente, se pueden utilizar diferentes técnicas en lugar de un ensayo ELISA y estas técnicas son bien conocidas en la materia. La característica que se ha de utilizar en todas estas técnicas es la generación de una curva estándar de las concentraciones conocidas de los complejos de factor VIIa-AT que es una característica exclusiva de la presente invención. Además, la naturaleza independiente del calcio del anticuerpo frente al factor VII/VIIa y la capacidad de este anticuerpo de unirse al factor VIIa incluso cuando el acomplejamiento para la AT es una característica nueva de la presente invención.

Utilizando el ELISA del factor VIIa-AT presentado en el ejemplo 1, se midieron los niveles de los complejos de factor VIIa-AT en 100 donantes de sangre normales. Todos los donantes presentaban complejos de factor VIIa-AT detectables en su plasma, con un nivel medio de 202 pM y un intervalo relativamente amplio (figura 2, Tabla I). Curiosamente, los niveles medios de los complejos de factor VIIa-AT representaban aproximadamente 2% del factor VII total, mientras que los niveles medios del factor VIIa activo representaban aproximadamente 0,7% del factor VII total (Morrissey, J. H. et al. 1993. "Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation", *Blood* 81: 734-744). Por consiguiente, los complejos de factor VIIa-AT existen en plasma a un nivel aproximadamente tres veces superior que el del factor VIIa activo.

Tabla I: niveles del factor VII en plasma

Especies	Concentración plasmática	% de factor VII total
Factor total VII	500 ng/ml = 10 nM	100%
Factor VIIa activo	3,6 ng/ml = 72 pM	0,7%
Complejos de factor VIIa-AT	10,1 ng/ml = 202 pM	2,0%

Esto sugiere que el reemplazo en curso del factor VIIa a través de la interacción catalizada por el factor tisular con antitrombina puede representar una vía importante por la cual se controlan que los niveles de factor VIIa. difiere de la opinión ortodoxa, que indica que TFPI es el inhibidor de plasma más importante del factor VIIa.

Se midieron los niveles plasmáticos de los complejos de factor VIIa y factor VIIa-AT en muestras idénticas de 17 donantes normales (figura 3). Existía una relación positiva débil entre los niveles del factor VIIa activo y los niveles

del factor VIIa-AT, peor no fue estadísticamente significativa ($p = 0,12$). Esto indica que los niveles del factor VIIa-AT no están ligados firmemente a los niveles del factor VIIa activo. Esto es debido probablemente a los diferentes niveles de exposición del factor tisular activo en sangre en los diferentes individuos.

- 5 Los niveles plasmáticos de los complejos de factor VIIa-AT cambiaron sustancialmente después de la administración intravenosa de una pequeña dosis de endotoxina bacteriana en voluntarios normales (Tabla II y figura 4). Esto refleja casi con certeza el incremento de la exposición del factor tisular en la sangre debido a la inducción de la expresión del factor tisular mediante los monocitos circulatorios.
- 10 Los cambios en los niveles de la exposición intravascular para el factor tisular se pueden medir monitorizando los cambios en los niveles plasmáticos de los complejos de factor VIIa-AT utilizando el ensayo de la presente invención. El procedimiento se puede utilizar para monitorizar a pacientes en los que se sospecha que se ha producido la activación de la cascada de la coagulación, y estas elevaciones en los niveles de VIIa-AT por encima de los niveles de referencia del paciente serán indicativos de una activación intravascular del sistema de coagulación. Los
- 15 pacientes en los que esto se puede utilizar incluyen pacientes con (o en los que se sospecha que presentan) sepsis, choque séptico, ARDS (síndrome de insuficiencia respiratoria aguda), cáncer, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio, apoplejía, embolismo pulmonar, complicaciones obstétricas (incluyendo preeclampsia y eclampsia), síndrome coronario agudo.

20 Tabla II: niveles de los complejos de factor VIIa-AT después de la exposición a la endotoxina

Tiempo (horas)	VIIa-AT (%del valor de referencia de los pacientes)
0	100
0,5	95
1,0	103
2,0	111
3,0	89
4,0	72
5	82
6	81
7	74
8	85
12	84
14	120
16	118

- En otra forma de realización, los valores de VIIa-AT se pueden utilizar como una forma sensible de monitorizar la eficacia de la terapia anticoagulante. Esto incluirá anticoagulantes por vía oral (warfarina y compuestos relacionados), y también heparina y derivados de la heparina. En otra forma de realización, los valores del factor VIIa-AT se pueden utilizar para monitorizar la eficacia de los nuevos anticoagulantes, especialmente los que tienen como diana el factor VIIa o el complejo de factor tisular-factor VIIa.
- 25

30 **Ejemplo 1: Ensayo ELISA para la medición del nivel plasmático de los complejos de factor VIIa-AT utilizando sustrato p-NPP (con la utilización de un agente bloqueante)**

El ensayo ELISA se utilizó para medir la concentración plasmática de los complejos de factor VIIa-antitrombina (factor VIIa-AT) en plasma humano y en otras muestras.

35 Preparación de los complejos de factor VIIa-AT para las estandarización del factor VIIa-AT ELISA

- Se prepararon 1,1 ml de una solución de factor VIIa 100 nM [Factor VIIa (recombinante); catálogo #407recB; American Diagnostica, Inc., Greenwich, CT] y sTF a 150 nM [proteína de factor tisular soluble recombinante producida mediante procedimientos conocidos en la técnica] en HBSA/calcio [HBSA/calcio: tampón Hepes 30 nM, pH 7,4, NaCl a 100 nM, CaCl₂ 5 nM, albúmina sérica bovina al 0,1% p/v, azida sódica al 0,1% p/v y se almacenó a una temperatura de 4°C].
- 40

Se extrajo una alícuota de 0,1 ml y se mantuvo en hielo para formar complejos de factor VIIa-sTF.

- 45 Al 1,0 ml restante de la mezcla de reacción, se le añadió heparina (catálogo #H3393; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) a una concentración final de 1 unidad/ml y antitrombina (anteriormente denominada antitrombina III; catálogo #HCATIII-0120; Haematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT) a una concentración final de 300 nM. La mezcla se incubó a una temperatura de 37°C durante 60 minutos y después se colocó en hielo para formar el factor VIIa-AT estándar (factor VIIa-sTF tratado con heparina y antitrombina).

- 50 Se extrajo una alícuota tanto de los complejos de factor VIIa-sTF como del factor VIIa-AT estándar, y se midió la

actividad enzimática del factor VIIa restante (a una concentración final de 5 nM factor VIIa), utilizando un sustrato Chromozim t-PA (catálogo #1 093 037, Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN) según el procedimiento proporcionado por Neuenschwander, et al. (Neuenschwander, P. F. et al. 1993. "Importance of substrate composition, pH and other variables on tissue factor enhancement of factor VIIa activity", *Thromb Haemost* 70: 970-977). Comparando la actividad de los complejos de factor VIIa-sTF con la actividad de los complejos de factor VIIa-AT en el factor VIIa-AT estándar, debería mantenerse menos del 5% de la actividad inicial después del tratamiento con heparina y antitrombina. Si se mantiene menos del 5% de la actividad original, entonces se considera que la concentración de complejos de factor VIIa-AT en la mezcla de reacción final es igual a la concentración de factor VIIa inicial. El factor VIIa-AT estándar se dividió en alícuotas de 50 µl y se congeló a una temperatura de -80°C.

El día de la utilización del ensayo de factor VIIa-AT ELISA, una alícuota del factor VIIa-AT estándar se descongeló rápidamente a una temperatura de 37°C y después se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta que se necesitara. El exceso de estándar se desechó.

Ensayo

Se diluyó un anticuerpo de anti-factor VII monoclonal #1172 IgG (Anticuerpo #1172; laboratorio Morrissey; hibridomas depositados como ATCC No. PTA-3497) hasta 1 µg/ml en de tampón de carbonato sódico 0,1 M [Tampón de carbonato: 4,20 g de bicarbonato sódico disuelto en 400 ml H₂O. Ajustado a un pH de 9,2 con hidróxido sódico, y la adición de una cantidad suficiente de H₂O para proporcionar un volumen final de 500 ml]. La solución de anticuerpo #1172 se pipeteó a 0,1 ml por pocillo en una placas ELISA de fondo plano de 96 pocillos (placas Costar EIA/RIA, catálogo #9018; Corning Inc., Corning, NY) y se incubaron durante la noche a una temperatura de 4°C.

Los pocillos se vaciaron golpeando suavemente la placa ELISA mientras se colocaba boca abajo. Los pocillos se enjuagaron una vez con TBS/EDTA/Tween [TBS: tampón Tris-HCl 50 nM pH 7,4, NaCl 100 nM, y 0,1% p/v de ázida sódica; TBS/EDTA/Tween: TBS con EDTA 10 nM (diluido a partir de EDTA 0,5M pH 7,4) y 0,1% p/v Tween-20].

Los pocillos se llenaron con BLOTTO [BLOTTO: 5% p/v leche desnatada en polvo en TBS] a aproximadamente 0,3 ml por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C o durante la noche a una temperatura de 4°C. (En este punto del protocolo, las placas se pueden mantener en el BLOTTO durante por lo menos una semana a una temperatura de 4°C). Los pocillos se vaciaron golpeando suavemente la placa ELISA mientras se colocaba boca abajo. Los pocillos se enjuagaron tres veces con TBS/EDTA/Tween.

Los factores VIIa-AT estándares y las muestras desconocidas (normalmente, muestras plasmáticas con citrato) se diluyeron en TBS/EDTA/BSA [TBS/EDTA/BSA: TBS con EDTA 10 nM (diluido de 0,5 EDTA pH 7,4) y albúmina sérica bovina 0,1%] de la siguiente forma:

muestras plasmáticas, diluidas veinte o cuarenta veces; factores VIIa-AT estándares para las concentraciones finales por pocillo de complejos de factor VIIa-AT de 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 pM. Para cada muestra o estándar, se pipetearon 0,1 ml en pocillos duplicados. Después de una incubación durante 1 hora a una temperatura de 37°C, los pocillos se vaciaron golpeando suavemente la placa ELISA mientras se colocaba boca abajo. Los pocillos se enjuagaron tres veces con TBS/EDTA/Tween.

Se diluyó un anticuerpo de conejo anti-humano antitrombina III (anticuerpo monoclonal; catalogo # A0296; DAKO Corp, Carpinteria, CA) en TBS/BSA/Tween hasta 0,1 µg/ml [TBS/BSA/Tween: TBS con de albúmina sérica bovina 0,1% p/v] y después se pipeteó en los pocillos a 0,1 ml por pocillo. Después de una incubación durante 1 hora a una temperatura de 37°C, los pocillos se vaciaron golpeando suavemente la placa ELISA mientras se colocaba boca abajo. Los pocillos se enjuagaron cuatro veces con TBS/Tween [TBS/Tween: TBS con Tween 20 0,1% v/v].

Se diluyó un conjugado de fosfatasa alcalina - IgG de burro anticonejo [Immunopure® Donkey Anti-rabbit IgG-alkaline (H+L), (min x BvChGtGuHaHsHnMsRtSh Sr Prot), conjugado de fosfatasa alcalina; catálogo #31345; Pierce Chemical Co., Rockville, IL] en TBS/BSA a 0,25 µg/ml [TBS/BSA: TBS con albúmina sérica bovina al 0,1% p/v de] y después se pipetearon en los pocillos a 0,1 ml por pocillo. Después de la incubación durante 1 hora a una temperatura de 37°C, los pocillos se vaciaron golpeando suavemente la placa ELISA mientras se colocaba boca abajo. Los pocillos se elavaron cuatro veces con TBS/Tween.

Después, se pipetearon 100 µl de solución p-NPP [Solución p-NPP: p-NPP (concentración final 1 mg/ml) en un tampón p-NPP (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, 5 nM, MgCl₂, y azida sódica al 0,02% p/v) justo antes de su utilización] en cada pocillo. Las placas ELISA se incubaron a una temperatura de 37°C durante aproximadamente 30 a 60 minutos, o hasta que se apreciara una buena formación de color en los estándares. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm de las placas de ELISA utilizando un lector de placas de 96 pocillos. Cuando fue necesario retrasar las lecturas de la absorbancia, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,1 ml EDTA 0,1M llevado a un pH de 9,5 con NaOH por pocillo.

Se preparó una curva estándar por extrapolación de la absorbancia a 405 nm (A₄₀₅) versus la concentración de factor VIIa-AT. Después, se leyeron los niveles de factor VIIa-AT de las muestras desconocidas a partir de la curva

estándar. Si las muestras desconocidas presentaban valores A_{405} superiores al punto más elevado de la curva estándar, la prueba se repetía a una dilución de factor VIIa-AT superior.

Ejemplo 2: ELISA para los complejos de factor VIIa-Antitrombina (VIIa-AT) (sin agente bloqueante)

Materiales. Los materiales utilizados en este ejemplo son los siguientes:

Anticuerpo monoclonal anti-factor VII – anticuerpo monoclonal murino calcio independiente preparadp frente al factor VII humano en el laboratorio Morrissey, las células de hibridoma depositadas como ATCC No. PTA-3497.

Antitrombina II anti-humana (anticuerpo monoclonal de conejo) – catálogo de DAKO número A0296.

Albúmina sérica bovina – catálogo de Calbiochem número 12659 (“Albumin, bovine serum, fraction V, low heavy metals”).

IgG de burro anticonejo (H+L), (min x BvChGtGuHaHsHnMsRtSh Sr Prot), Immunopure®, Conjugados de fosfatasa alcalina – catálogo de Pierce número 31345.

Placas ELISA – Placas Costar EIA/RIA de fondo plano de Corning Inc. (número de Corning/Costar 9018).

Factor VII plasma deficiente – factor VII congénito plasma deficiente (con citrato) de George King Biomedical, Inc. (www.kingbiomed.com).

pNPP (p-nitrofenilo fosfatasa) – Catálogo Sigma número N1891 (SIGMA FASTTM p—Nitrophenil Phosphatase Tablet Sets; 5 mg/Tablet).

Soluciones. Las soluciones utilizadas en el ensayo ELISA se prepararon de la forma siguiente. Excepto que se indique lo contrario, las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente:

Tampón carbonato: tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,2. Se prepara disolviendo 4,20 g de bicarbonato sódico en 400 ml H₂O; ajuste del pH a 9,2 mediante la adición a gotas de NaOH 10 N. El volumen final se lleva a 500 ml con H₂O.

TBS: tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 100 mM; azida sódica 0,02% p/v.

Tampón de lavado: 0,1% Tween-20 en TBS.

Diluyente de la muestra: 0,1% p/v albúmina sérica bovina, 0,1% Tween-20, y EDTA 10 mM en TBS. Almacenado a una temperatura de 4°C. (Utilización de una solución madre de EDTA a pH 7,5 para su preparación).

Diluyente del anticuerpo: 0,1% p/v albúmina sérica bovina y 0,1% Tween-20 en TBS. Almacenado a una temperatura de 4°C.

Tampón pNPP: tampón 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; azida sódica 0,02% p/v.

Solución pNPP: Disolver pNPP (1 mg/ml final) en tampón pNPP justo antes de su uso (un comprimido de 5 mg por 5 ml de tampón pNPP).

Preparación de complejos VIIa-AT para la estandarización de VIIa-AT ELISA

Materiales y soluciones

Antitrombina (antitrombina III) – Haematologic technologies, Inc. Número de catálogo HCATIII-120.

Albúmina sérica bovina – Número de catálogo de Calbiochem 12659 (“Albumin, bovine serum, fraction V, low heavy metals”).

Sustrato Chromozim t-PA – Número de catálogo de Roche Diagnostics 1 093 037.

Factro VIIa (recombinante) – Número de catálogo de America Diagnostica 407recB.

Heparina- habitualmente de Sigma (número de catálogo H9399); existen muchos otros proveedores de heparina.

sTF – factor tisular soluble recombinante humano (aminoácidos 1-219). (Morrissey, J. H. 1987. *Cel* 50: 129-135).

HBSA/calcio: tampón Hepes 30 mM, pH 7,4; almacenado a una temperatura de 4°C. NaCl 100 mM; CaCl₂ 5 mM;

albúmina sérica bovina 0,1% p/v; azida sódica 0,02% p/v.

Procedimiento. Este procedimiento se puede ampliar para crear soluciones madre más amplias de factor VIIa-AT estándares.

- 5 1. Preparar una solución de 1,1 ml de factor VIIa 100 nM y sTF 150 nM en HBSA/calcio.
2. Extraer una alícuota de 0,1 ml y conservarla en hielo.
3. En la mezcla de reacción de 1,0 ml restante, añadir heparina a una concentración final de 10 unidades/ml y antitrombina a una concentración final de 400 nM.
- 10 4. Incubar la mezcla a una temperatura de 37°C durante 60 minutos, después colocar la mezcla en hielo.
- 15 5. Extraer una pequeña alícuota de cada mezcla (de las etapas 2 y 4) y medir la actividad enzimática de factor VIIa restante (a una concentración final de factor VIIa 5 nM), utilizando sustrato Chromozyn t-PA. (Neuenschwander P. F. Et al. 1993. "Importance of substrate composition, pH and other variables on tissue factor enhancement of factor VIIa activity", *Throm Haemost* 70: 970-977). Comparar la actividad de los complejos de factor VIIa-sTF en la alícuota extraída en la etapa 2 con la actividad restante después de la incubación con heparina y antitrombina en la etapa 4. Se espera encontrar menos de un 5% de la actividad inicial restante después del tratamiento con heparina y antitrombina. Si se pasa esta prueba (permanece menos de un 5% de la actividad original), se considera que la concentración de los complejos de VIIa-AT en la mezcla de reacción final es igual a la concentración de factor VIIa inicial.
- 20 6. Dividir la solución de partida en alícuotas de 50 µl y congelar a una temperatura de -80°C.
- 25 7. El día de su utilización, descongelar una alícuota de VIIa-AT estándares rápidamente a 37°C y después reservarla a una temperatura de 4°C hasta que se necesite. Desechar los excedentes; no congelar.

Técnicas de lavado

30 El lavado de las placas ELISA se puede conseguir a mano o utilizando lavados automatizados de placas ELISA. Los ejemplos adecuados de técnicas de máquinas de lavado automatizadas son los siguientes. Para la máquina de lavado de placas ELISA automatizada SKan Washer 300 se han utilizado tres ciclos de aspiración 2,5 segundos, lavado 400 NI, remojo 15 segundos, seguido de un ciclo de aspiración final de 8 segundos. Para la máquina de lavado de placas automatizada comercial MultiWash Advantage, que utiliza tres ciclos de lavado de 0,8 ml según los ajustes siguientes: velocidad = 45; remojo = 60 segundos; modo = lavado de placa; lavado de fondo = apagado y aspiración transversal = encendido.

40 Para el lavado a mano, primero vaciar los pocillos "golpeando suavemente" la placa boca abajo en la batea. Después, llenar los pocillos con la solución de lavado dispensada a través de una botella de plástico. (Evitando generar burbujas). Cuando se han llenado todos los pocillos, vaciar otra vez la placa "golpeándola suavemente" y comenzar el proceso de nuevo. Al final del tercer lavado, vaciar los pocillos completamente dando golpes suaves repetidamente a la placa en posición boca abajo sobre varias toallitas de papel en la poyata del laboratorio. Realizar esta acción hasta que no se observe líquido en los pocillos.

Ensayo

50 En este ejemplo, se diluyó el anticuerpo monoclonal anti-factor VII a 1 µg/ml en un tampón carbonato. Se pipetearon 0,1 ml en cada pocillo de una placa ELISA y se incubaron durante la noche a una temperatura de 4°C. Después, los pocillos se enjuagaron tres veces con el tampón de lavado.

55 Se extrajeron los VIIa-AT estándares almacenados en el congelador, se descongelaron rápidamente a una temperatura de 37°C, y después se colocaron en hielo hasta el momento de su utilización. Se descartaron los excesos de estándares no utilizados en el ensayo ELISA. (Los estándares no se deberían volver a utilizar o congelar, deberían desecharse). 10 µl de estándares VIIa-AT a 100 nM se diluyeron en 10 ml de diluyente de muestra (da como resultado una solución de partida de 100 pM). Después, la solución de partida de 100pM se diluyó más tal como se muestra en la Tabla III.

Tabla III: dilución de los estándares VIIa-AT

Concentración final	Solución de partida 100 PM μ l	Diluyente de la muestra μ l
0 pM	0	300
5 pM	15	285
10 pM	30	270
15 pM	45	255
20 pM	60	240
25 pM	75	225
30 pM	90	210

5 La muestras desconocidas (muestras plasmáticas con citrato) se diluyeron veinte veces en diluyente de la muestra. Estos se consiguió añadiendo 15 μ l del plasma probado a 285 μ l de diluyente de la muestra.

10 Por cada muestra o estándar, se pipetearon 0,1 ml de las diluciones descritas anteriormente en cada uno de los dos pocillos y se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Después de la incubación, los pocillos se enjuagaron tres veces con el tampón de lavado.

15 La antitrombina III anti-humana de conejo (DAKO) se diluyó hasta 0,1 μ g/ml de en el diluyente del anticuerpo de la siguiente forma. Para una solución madre de 1,3 mg/ml, se mezclaron 3 μ l con 36 μ l de diluyente de anticuerpo para proporcionar anticuerpo IgG a 100 μ g/ml. Después, se mezclaron 12 μ l del anticuerpo diluido con 12 ml del diluyente del anticuerpo para proporcionar 0,1 μ g/ml. Se añadieron 0,1 ml por pocillo de anticuerpo antitrombina III anti-humano de conejo a 0,1 μ g/ml y se incubó durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Después, los pocillos se enjuagaron tres veces con el tampón de lavado.

20 El conjugado de fosfatasa alcalina IgG de burro anticonejo se diluyó hasta 0,25 μ g/ml en el diluyente del anticuerpo de la siguiente forma. Para una solución madre de 600 μ g/ml, se mezclaron 5 μ l con 12 ml de diluyente del anticuerpo para proporcionar 0,25 μ g/ml IgG. Se añadieron 0,1 ml a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Después, los pocillos se enjuagaron tres veces con el tampón de lavado.

25 Después, se pipetearon 100 μ l de solución pNPP en cada pocillo. Las placas se incubaron durante aproximadamente 30 a 60 minutos a una temperatura de 37°C (hasta que se observó una buena formación de color en los estándares- a veces requiere más tiempo). El estándar más elevado (30 pM) debería presentar un A_{405} de aproximadamente 1,5.

30 La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas de 96 pocillos. Si se desea, la reacción se puede detener añadiendo 0,1 ml de 0,1 M EDTA (ajuste del pH a 9,5 con NaOH) por pocillo. Detener la reacción sólo es necesario si se desea retrasar la lectura.

35 Se preparó una curva estándar representando la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm *versus* la concentración de VIIa-AT. Después, se leyeron los niveles de VIIa-AT de las muestras desconocidas de la curva estándar. La placa se leyó en un lector de microplacas Molecular Devices SPECTRAMax PLUS 384 (sin sustracción del ruido de fondo) y se encajó en los datos un segundo orden polinomial. La curva estándar se puede observar en la figura 5.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la medición de la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de un paciente que comprende las etapas siguientes:

mezclar una cantidad de dicha muestra plasmática con un anticuerpo de captura primario fijado a una fase sólida, estando dicho anticuerpo primario caracterizado porque presenta una capacidad de unión

- a) a la parte de factor VIIa o
- b) a la parte de antitrombina

de los complejos de factor VIIa-antitrombina que pudieran estar presentes en dicha muestra plasmática, e incubar dicha mezcla bajo unas condiciones que promuevan la unión entre dicho anticuerpo de captura y dichos complejos de factor VIIa-antitrombina que pudieran estar presentes en dicha muestra plasmática para formar complejos de factor VIIa-antitrombina unidos y una mezcla no unida;

extraer dicha muestra no unida;

mezclar dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos con un anticuerpo secundario caracterizado porque presenta una capacidad de unión

- a) a la parte de antitrombina o
- b) a la parte de factor VIIa, respectivamente,

de dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos para formar complejos de factor VIIa-antitrombina-anticuerpo secundario unidos y una mezcla de anticuerpo secundario no unido;

extraer cualquier mezcla de anticuerpo secundario no unido;

determinar la cantidad de anticuerpo secundario unido; y

comparar la cantidad de anticuerpo secundario unido con una cantidad estándar de anticuerpo secundario unido determinada para los complejos de factor VIIa-antitrombina unidos de una concentración conocida.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha cantidad estándar de anticuerpo secundario unido se determina para una pluralidad de concentraciones conocidas de complejos de factor VIIa-antitrombina unidos mezclando una cantidad de dicha concentración conocida de complejos de factor VIIa-antitrombina con un anticuerpo de captura primario caracterizado porque presenta una capacidad de unión

- a) a la parte de factor VIIa o
- b) a la porción de antitrombina

de los complejos de factor VIIa-antitrombina e incubando dicha mezcla bajo unas condiciones que promuevan la unión entre dicho anticuerpo de captura y dichos complejos de factor VIIa-antitrombina para formar los complejos de factor VIIa-antitrombina unidos; extrayendo la mezcla no unida; mezclando dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos con un anticuerpo secundario caracterizado porque presenta una capacidad de unión

- a) a la porción de antitrombina o
- b) a la parte de factor VIIa

de dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos; extrayendo cualquier anticuerpo de captura no unido; y

determinando la cantidad de anticuerpo secundario unido; y correlacionando dichas concentraciones conocidas de complejos de factor VIIa-antitrombina con dicha cantidad de anticuerpo secundario unido para formar una curva estándar.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo secundario es detectable mediante un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en marcador enzimático, marcador radioisotópico, marcador no radioactivo, marcador fluorescente, marcador de toxinas y marcador quimioluminiscente.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que un anticuerpo terciario caracterizado porque presenta una capacidad de unión a dicho anticuerpo secundario unido se hace reaccionar con dicho anticuerpo secundario unido, siendo dicho anticuerpo terciario detectable mediante un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en marcador enzimático, marcador por radioisotópico, marcador no radioactivo, marcador fluorescente, marcador de toxinas y marcador quimioluminiscente.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se miden los cambios en la exposición intravascular del factor tisular de un paciente, que comprende

5 en un primer momento, mezclar una cantidad de dicha muestra plasmática del paciente con un anticuerpo de captura primario fijado a una fase sólida, estando dicho anticuerpo de captura caracterizado porque presenta una capacidad de unión a complejos de factor VIIa-antitrombina que pudieran estar presentes en dicha muestra plasmática, e incubar dicha mezcla bajo unas condiciones que promuevan la unión entre dicho anticuerpo de captura y dichos complejos de factor VIIa-antitrombina que pudieran estar presentes en dicha muestra plasmática para formar los complejos de factor VIIa-antitrombina unidos y una mezcla no unida;

10 extraer dicha mezcla no unida;

15 mezclar dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos con un anticuerpo secundario caracterizado porque presenta una capacidad de unión a dichos complejos de factor VIIa-antitrombina unidos para formar los complejos de factor VIIa-antitrombina-anticuerpo secundario unidos y el anticuerpo secundario no unido;

extraer dicho anticuerpo secundario no unido;

20 determinar la cantidad de anticuerpo secundario unido; y

25 comparar la cantidad de anticuerpo secundario unido con una cantidad estándar de anticuerpo secundario unido determinada para los complejos de factor VIIa-antitrombina unidos de una concentración conocida para obtener la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en dicha muestra plasmática del paciente en dicho primer momento;

30 en un segundo momento, determinar la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en dicha muestra plasmática del paciente mediante la repetición del procedimiento utilizado en dicho primer momento, y comparar la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en cada momento para comprobar si la cantidad aumenta, disminuye o permanece igual,

35 en el que un aumento en la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en dicha muestra plasmática del paciente en dicho segundo momento en comparación con la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en dicha muestra plasmática del paciente en dicho primer momento representa un aumento en dicha exposición intravascular del factor tisular del paciente y en el que una disminución de la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en dicha muestra plasmática del paciente en dicho segundo momento en comparación con la concentración de complejos de factor VIIa-antitrombina en dicha muestra plasmática del paciente en dicho primer momento representa una disminución en dicha exposición intravascular del factor tisular del paciente.

40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo de captura unido se une a la parte de factor VIIa de un complejo de factor VIIa-antitrombina.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo de captura unido se une a la porción de antitrombina de un complejo de factor VIIa-antitrombina.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se mide el riesgo del paciente de entrar en un estado hipercoagulable, que comprende

50 medir la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en un primer momento;

medir la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en un segundo momento; y

55 comparar la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en dicho segundo momento con cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en dicho primer momento,

60 en el que un aumento de la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en dicho segundo momento con respecto a la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en dicho primer momento indica un aumento del riesgo de dicho paciente de entrar en un estado hipercoagulable y en el que una disminución de la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en dicho segundo momento con respecto a la cantidad de complejos de factor VIIa-antitrombina en una muestra plasmática de dicho paciente en dicho primer momento indica una disminución del riesgo de dicho paciente de entrar en un estado hipercoagulable.

9. Procedimiento para la monitorización de la eficacia de la terapia anticoagulante *in vitro* evaluando los complejos de factor VIIa-antitrombina mediante el procedimiento según la reivindicación 1 en un primer momento y en un segundo momento, y comparando los valores obtenidos en el que un aumento en dichos complejos en dicho segundo momento indica un posible fracaso de dicha terapia o la necesidad de un ajuste de dicha terapia para evitar la aparición de eventos de coagulación no deseados.
- 5

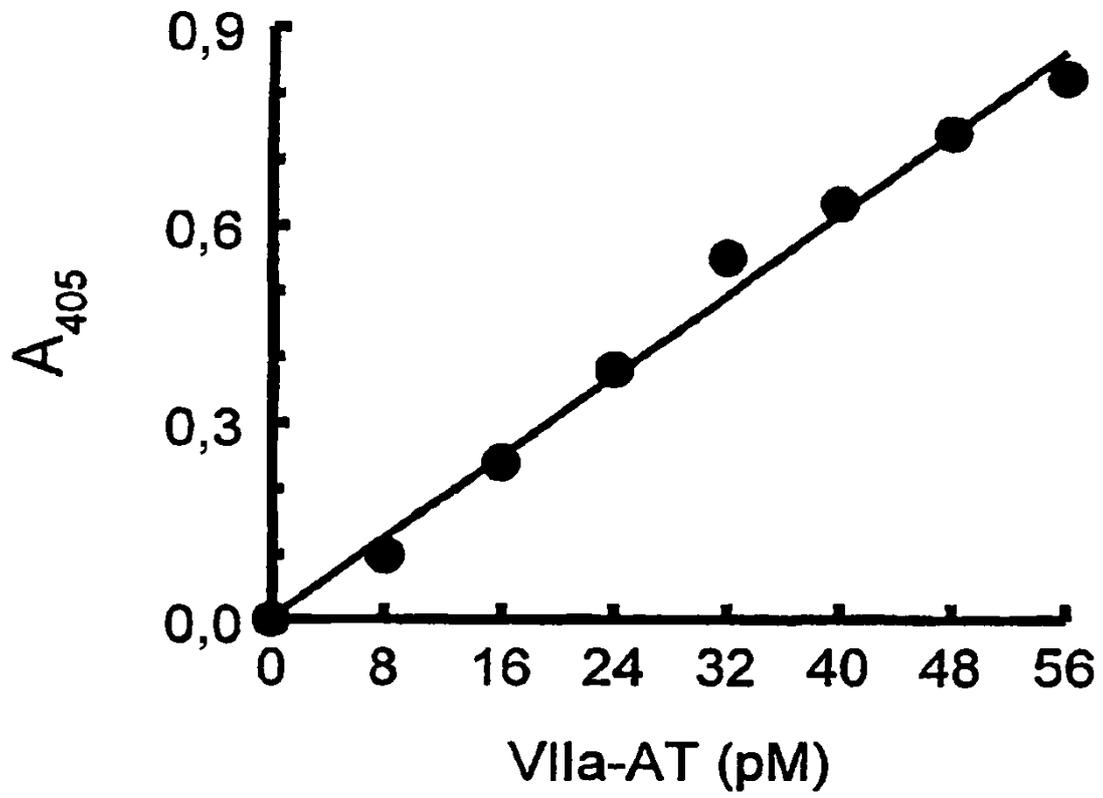


Fig. 1

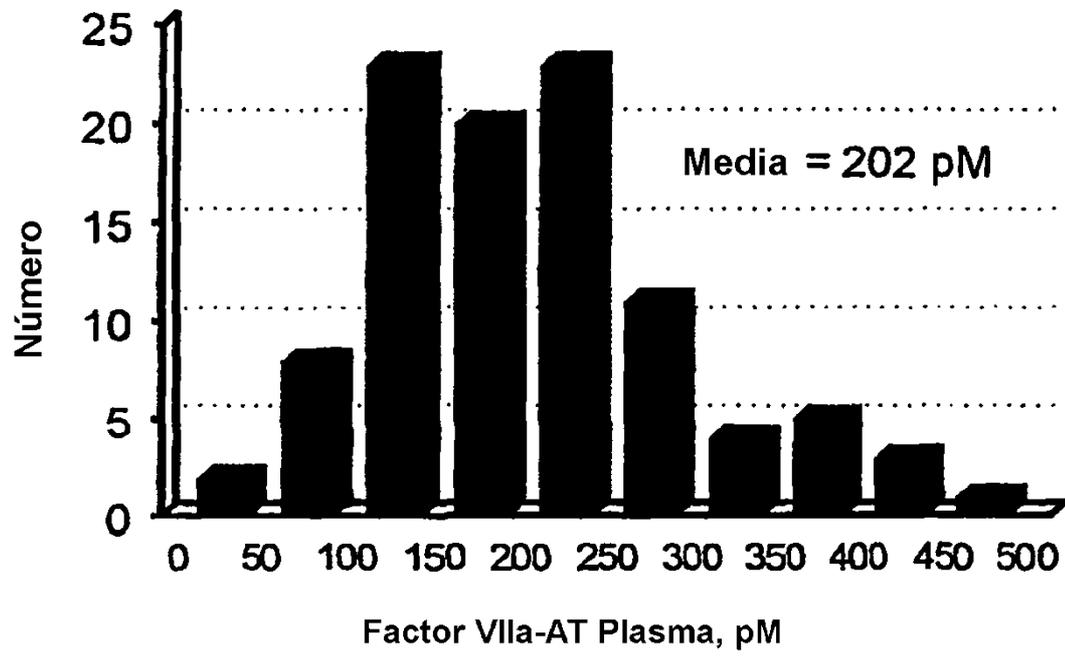
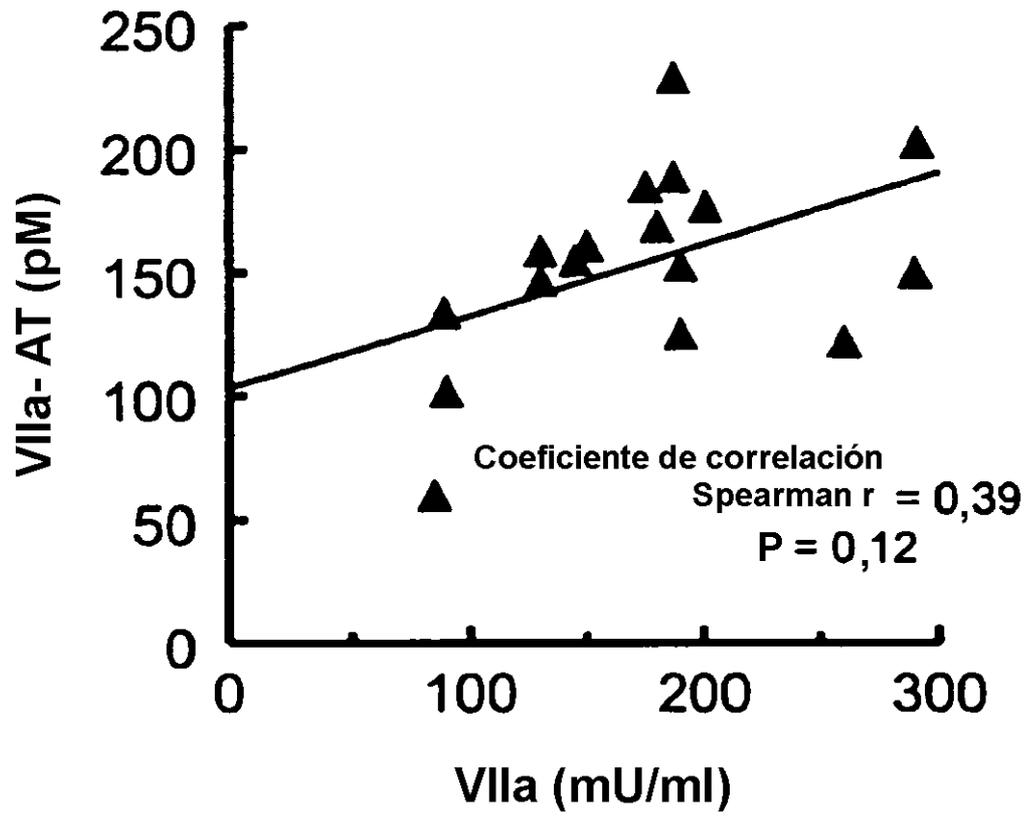


Fig. 2

FIG. 3



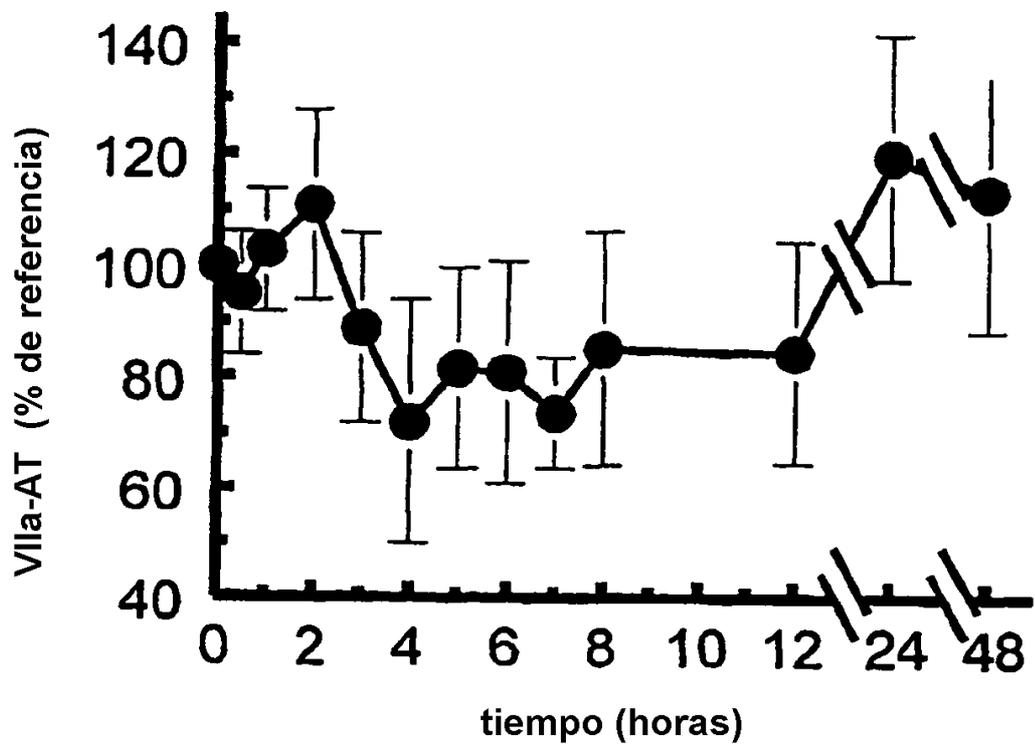


Fig. 4

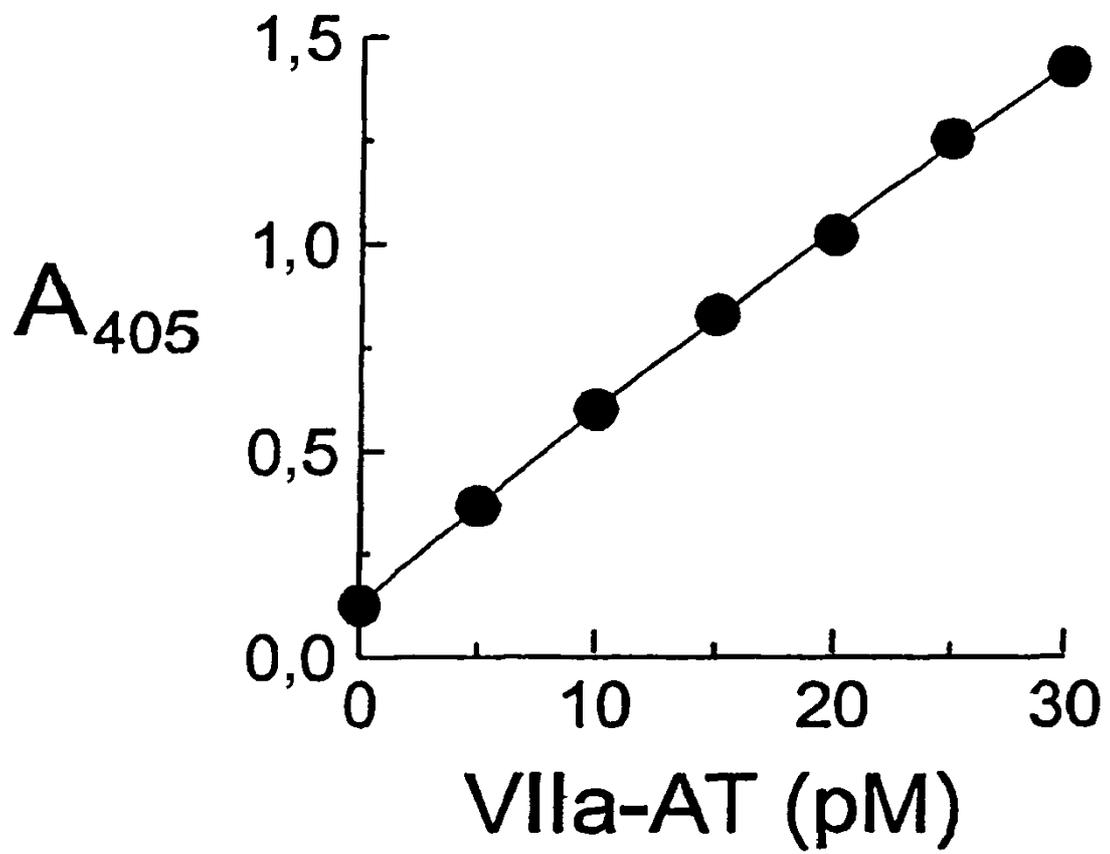


Fig. 5