

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 004**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2013** **E 13156497 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 2634584**

54 Título: **Método de criba para detectar muestras con anticuerpos de antifosfolípido**

30 Prioridad:

28.02.2012 EP 12157223

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

03.02.2015

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

PATZKE, JUERGEN, DR.

ES 2 528 004 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

Método de criba para detectar muestras con anticuerpos de antifosfolípido

La invención se encuentra en el campo del diagnóstico de coagulación y se refiere a un método de criba para detectar muestras que contienen anticuerpos de antifosfolípido.

5 El síndrome de antifosfolípido (APS, antiphospholipid syndrome) es uno de los desórdenes autoinmunes más comunes y causa trombosis, abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. El síndrome de antifosfolípido es causado por los llamados anticuerpos de antifosfolípido (APA) los cuales se enlazan a fosfolípidos aniónicos, a proteínas o a complejos proteína/fosfolípido. Los anticuerpos de antifosfolípido que forman complejos con determinadas proteínas y fosfolípidos son un grupo muy heterogéneo de autoanticuerpos que pueden dirigirse
10 contra una multiplicidad de antígenos tales como, por ejemplo, contra la apolipoproteína β 2-glicoproteína I (β 2GPI), cardiolipina, protrombina, proteína C, proteína S, annexina V, trombomodulina, factor XII y otros, así como contra complejos de estas proteínas con fosfolípidos.

Los llamados anticoagulantes de lupus son anticuerpos de antifosfolípido que por definición prolongan los tiempos de coagulación de determinados ensayos de coagulación como, por ejemplo, de aPTT. De modo paradójico, los
15 anticoagulantes de lupus inhiben la reacción de coagulación *in vitro* mientras que una reacción de coagulación elevada (hipercoagulabilidad) acompaña el síndrome de antifosfolípido (APS) *in vivo*. Sin embargo, también existen anticuerpos de antifosfolípido que no están cubiertos por estos ensayos y que aún así tienen un efecto protrombótico.

Aún no ha sido aclarado de manera concluyente cómo los anticuerpos de antifosfolípido despliegan su efecto
20 protrombótico *in vivo*. Un mecanismo de acción parece transcurrir por la activación de plaquetas sanguíneas (trombocitos) (Urbanus, R.T. et al., Platelets and the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008 Oct; 17(10): 888-94).

El diagnóstico del síndrome de antifosfolípido (APS) en el laboratorio se ve dificultado por la heterogeneidad de los anticuerpos de antifosfolípido. Para la detección directa de los anticuerpos se aplican métodos inmunológicos. Sin embargo, de esta manera también se arrastran muchos anticuerpos que no tienen efecto protrombótico *in vivo*. Para
25 la detección indirecta de los anticuerpos se aplican pruebas de coagulación. Pruebas particulares que se basan en la determinación del DRVVT (Dilute Russell's Viper Venom Time o tiempo de veneno de víbora diluido de Russell) muestran una correlación relativamente buena con la eficiencia protrombótica de los anticuerpos de antifosfolípido. El diagnóstico de lupus requiere de mucho esfuerzo porque cada muestra de los pacientes tiene que someterse a varios pasos de análisis (para una visión general: Devreese, K. and Hoylaerts, M.F., Challenges in the diagnosis of
30 the antiphospholipid syndrome (Retos en el diagnóstico del síndrome de antifosfolípido). *Clin. Chem.* 2010, 56(6): 930-940).

Por lo tanto, sería deseable disponer de un ensayo de criba que haga posible identificar muestras que contienen con una alta probabilidad anticuerpos de antifosfolípido con efecto protrombótico. Esto tendría la ventaja de que con los
35 métodos de detección específicos costosos solamente tendrían que analizarse aquellas muestras para las cuales se ha revelado un primer indicio de la presencia de anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos.

Por lo tanto, el objetivo fundamental de la presente invención es proporcionar un método que haga posible identificar muestras que con una alta probabilidad contienen anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos.

Este objetivo se logra mediante un método que tiene los siguientes pasos:

- 40 a) mezclar una muestra de un paciente con un reactivo que contiene plaquetas sanguíneas para dar lugar a una mezcla de ensayo,
- b) adicionar un activador de plaquetas sanguíneas a la mezcla de ensayo, y
- c) medir la aglomeración de plaquetas sanguíneas en la mezcla de ensayo.

Una aglomeración de plaquetas sanguíneas elevada en la mezcla ensayo indica la presencia de anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos en la muestra de paciente.

45 Se ha encontrado que en una mezcla de la muestra del paciente y reactivo que contiene plaquetas sanguíneas, los anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos que están contenidos en la muestra del paciente, aumentan la aglomeración de las plaquetas sanguíneas. En efecto, el ensayo no es específico para anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos porque otros factores que estimulan la aglomeración de plaquetas sanguíneas, como por ejemplo un nivel elevado de trombina, también pueden conducir a una aglomeración aumentada de plaquetas. No obstante,

pueden eliminarse las muestras que no aumentan la aglomeración de las plaquetas en el ensayo y no tienen que analizarse en ensayos posteriores para la determinación específica de anticuerpos de antifosfolípido.

5 El término "anticuerpos de antifosfolípido protrombótico" designa anticuerpos de antifosfolípido que prolongan in vitro el tiempo de coagulación de una muestra de plasma. Una prolongación del tiempo de coagulación puede determinarse, por ejemplo, con ayuda de un ensayo de coagulación con base en DRVVT. Sin embargo, la sensibilidad de tal ensayo de "anticoagulante de lupus" no es suficiente para reconocer algunos anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos. Es probable que el método de la invención presente una mejor sensibilidad porque en tal caso también se mide la acción protrombótica in vitro. En lugar de la acción inhibitoria de coagulación, se mide la acción real promotora de aglomeración de plaquetas in vitro.

10 El término "muestra del paciente" comprende en primera línea fluidos corporales, principalmente plasma rico en plaquetas, plasma pobre en plaquetas, suero y sangre entera.

15 El término "reactivo que contiene plaquetas" comprende suspensiones que contienen plaquetas con capacidad funcional, es decir de aglomeración (trombocitos) de origen humano. Puede ser, por ejemplo, una suspensión de plaquetas aisladas en una solución de búfer. Por el término "suspensiones" también se entienden re-suspensiones de plaquetas secas por congelamiento. De modo alternativo, puede ser plasma rico en plaquetas o sangre entera de un donante o plasma combinado de varios donantes.

20 Por el término "activador de plaquetas" se entiende una sustancia que puede inducir la aglomeración de trombocitos. Activadores de plaquetas adecuados son, por ejemplo, ADP (adenosin-5'-difosfato), colágeno, epinefrina, ácido araquidónico, ristocetina y trombina. También pueden adicionarse a la mezcla de ensayo combinaciones de activadores de plaquetas, por ejemplo un acumulado de colágeno y ADP (Col/ADP) o un acumulado de colágeno y epinefrina (Col/Epi).

La concentración preferida de epinefrina se encuentra entre 1 y 20 $\mu\text{mol/L}$ en la mezcla de ensayo. La concentración preferida de ADP se encuentra entre 0,2 y 30 $\mu\text{mol/L}$ en la mezcla de ensayo, particularmente preferible entre 0,2 y 10 $\mu\text{mol/L}$ en la mezcla de ensayo.

25 La determinación cuantitativa de la aglomeración de plaquetas en la mezcla de ensayo que se correlaciona con la acción estimulante de aglomeración de plaquetas de los anticuerpos de antifosfolípido contenidos en la muestra del paciente puede efectuarse mediante la medición de la intensidad de luz dispersa (nefelométricamente) o mediante la medición de la turbiedad de la mezcla ensayo (turbidimétricamente).

30 De manera preferente se mide la velocidad de la aglomeración de plaquetas en la mezcla de ensayo. La medición de la velocidad de aglomeración de plaquetas dentro del período de 12 a 50 segundos después de adicionar un activador de plaquetas a la mezcla ensayo ha demostrado ser de gran valor informativo. De modo alternativo, puede determinarse la velocidad máxima de aglomeración de plaquetas.

35 En otra forma de realización del método de la invención, la medición de la aglomeración de plaquetas tiene lugar en condiciones de flujo y por lo tanto en presencia de altas fuerzas de corte (cizalladura). Un principio de ensayo de este tipo se implementa, por ejemplo, en el sistema de análisis Platelet Function Analyzer System (PFA-100®, PFA-200, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Alemania). Este método de medición es adecuado principalmente en el caso en que la muestra de paciente y/o el reactivo que contiene plaquetas consiste de sangre entera.

40 Para simular las condiciones de flujo y las fuerzas de corte tal como rigen en vasos sanguíneos arteriales más pequeños, en una celda de medición especial se genera una presión negativa de aproximadamente -40 milibares y la sangre entera con citrato que se encuentra en un reservorio de muestra fluyen a través de un capilar que tiene un diámetro de aproximadamente 100-200 μm . El capilar desemboca en una cámara de medición que está cerrada con un elemento de separación, por ejemplo una membrana que contiene una abertura capilar central (abertura), a través de la cual pasa la sangre debido a la presión negativa. En la mayoría de los casos, la membrana está
45 provista, al menos en el sector alrededor de la abertura, con uno o varios activadores que inducen la aglomeración de plaquetas de modo que la sangre que fluye entre en contacto con las sustancias que inducen aglomeración en el sector de la abertura. A causa de la adhesión y la aglomeración inducidas de los trombocitos, en el sector de la abertura se forma un coágulo de trombocitos (trombo), el cual cierra la abertura de la membrana y detiene el flujo de sangre. En este sistema habitualmente se mide el tiempo que se necesita hasta el cierre de la abertura de la
50 membrana. Este llamado tiempo de clausura (CT) se correlaciona con la funcionalidad de los trombocitos. Una celda de medición para usarse en un método para determinar la función de trombocitos por medio del tiempo de clausura se describe, por ejemplo, en el documento de patente WO 97/34698. Celdas de medición preferidas se equipan con una membrana que se recubre con colágeno (Col) y adicionalmente ya sea con ADP o con epinefrina (Epi) o se recubre con ADP y prostaglandina E1 (PGE1). Diferentes elementos de separación, así como su producción y
55 utilización, se describen, por ejemplo, en el documento de patente EP-B1-716744 o en EP-A1-1850134.

En una modalidad preferida del método de la invención, la medición de la actividad de trombocitos abarca de esta manera pasar la muestra que ha sido mezclada con el reactivo que contiene plaqueta a través de un capilar y luego a través de una abertura de un elemento de separación y medir el tiempo necesitado para que se forme un coágulo de placa en la abertura del elemento de separación hasta que se cierre la abertura.

- 5 Cuando están contenidos anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos en la muestra, la adición de la muestra al reactivo que contiene plaqueta, que se compone preferiblemente de sangre entera, provoca un acortamiento del tiempo de clausura en comparación con la adición de una muestra normal que no contiene anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos (figura 4).

Además, se prefiere la determinación de una proporción (cociente) del resultado de ensayo de la muestra del paciente al resultado de ensayo de una muestra normal (norma). Una muestra normal puede ser una muestra de un donante sano o una acumulado de muestras de varios donantes sanos. Para este propósito, en un segundo ensayo, se mezcla una muestra normal que no contiene anticuerpos de antifosfolípido con el reactivo que contiene plaqueta para producir una mezcla de ensayo, la aglomeración normal de plaquetas se mide y los resultados de ensayo se ponen en forma de proporción. Una proporción mayor a 1.0 de la aglomeración de plaquetas medida en la mezcla de ensayo de la muestra del paciente a la aglomeración de plaquetas normal indica la presencia de anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos en la muestra del paciente.

Descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 muestra la velocidad de la aglomeración de plaquetas inducida por epinefrina (mE/s) en una muestra de un donante evidentemente sano en una muestra combinada de plasma normal y en muestras de 5 pacientes con síndrome de antifosfolípido dependiente de la proporción LA1/LA2. Se emplearon dos reactivos diferentes que contienen plaqueta: reactivo PRP A (círculos) y reactivo PRP (cuadrados). Las muestras de pacientes con síndrome de antifosfolípido (LA1/LA2 mayor a 1) exhiben una aglomeración aumentada de plaquetas frente a las muestras normales (LA1/LA2 = 1).

Figura 2

La figura 2 muestra el cociente entre la velocidad de la aglomeración de plaquetas inducida por epinefrina en una muestra de un donante evidentemente sano y en muestras de 5 pacientes con síndrome de antifosfolípido y la velocidad de la aglomeración de plaquetas inducida por epinefrina en una muestra combinada de plasma normal (proporción paciente/plasma normal) en dependencia de la proporción LA1/LA2. Se emplearon dos reactivos diferentes que contienen plaqueta: reactivo PRP A (círculos) y reactivo PRP B (cuadrados). Las muestras de pacientes con síndrome de antifosfolípido (LA1/LA2 mayor a 1) muestran una proporción elevada de paciente/plasma normal frente a las muestras normales (LA1/LA2 = 1).

Figura 3

La figura 3 muestra el cociente de la velocidad de aglomeración de plaqueta inducida por ADP en una muestra de un donante evidentemente sano y en muestras de 5 pacientes con síndrome de antifosfolípido sobre la velocidad de la aglomeración de plaquetas inducida por ADP en una muestra combinada de plasma normal (proporción paciente/plasma normal) dependiendo de la proporción LA1/LA2. Se emplearon dos reactivos diferentes que contienen plaqueta: reactivo PRP C (círculos) y reactivo PRP D (cuadrados). Las muestras de pacientes con síndrome de antifosfolípido (LA1/LA2 mayor a 1) muestran una proporción aumentada paciente/plasma normal frente a las muestras normales (LA1/LA2 = 1).

Figura 4

La figura 4 muestra que los anticuerpos de antifosfolípido en una muestra (acumulado de plasma-lupus, barras finamente sombreadas) combinada con una muestra (acumulado plasma normal, barras sombreadas de manera gruesa), que no contiene anticuerpos de antifosfolípido, provocan un acortamiento del tiempo de clausura en el sistema de análisis de la función de plaqueta (Platelet Function Analyzer System). Se emplearon cuatro reactivos diferentes que contienen plaqueta (1-4) a partir de sangre entera fresca de diferentes donantes sanos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medición de la acción estimulante de aglomeración de plaquetas de anticuerpos de antifosfolípido en plasma de pacientes

Como plasma de pacientes se emplearon muestras de 5 pacientes con síndrome de antifosfolípido, una muestra de un donante evidentemente sano y acumulado de plasma normal (plasma de control N, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania).

5 Como reactivo que contiene plaqueta se usó plasma humano rico en plaquetas (reactivo PRP), el cual se había producido a partir de sangre fresca de donantes de sangre evidentemente sanos mediante centrifugación (180 g, 10 min). Se produjeron 4 reactivos que contenían plaquetas (A, B, C, D) a partir de sangre de 4 donantes diferentes.

10 135 µL del reactivo PRP se mezclaron con 40 µl de plasma de paciente y se incubaron a 37 °C. Después de cinco minutos, se adicionaron 15 µL de solución de epinefrina (100 µmol/L de epinefrina) o 15 µL de solución de ADP (12 µmol/L de ADP) para la activación de las plaquetas, y se midió la extensión de la mezcla de ensayo a 620 manómetros por medio de turbidimetría. Como medida para la aglomeración de plaquetas se determinó el cambio de extinción en el período de tiempo de 12-50 segundos (mE/segundo) después de adicionar el activador de plaquetas.

15 En paralelo se analizaron todas las muestras con ayuda de un ensayo disponible comercialmente, con base en un ensayo de coagulación DRVVT para la detección de anticoagulantes de lupus (reactivo de criba LA1/reactivo de confirmación LA2, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH). La llamada proporción LA1/LA2 de donantes sanos es casi 1. Si la proporción LA1/LA2 es marcadamente superior a 1, esto apunta de manera muy fuerte a una enfermedad del síndrome de antifosfolípido. La severidad de dicha ocurrencia se correlaciona con el nivel de la proporción LA1/LA2.

20 Puesto que el plasma rico en plaquetas de diferentes donantes, el cual se utilizó aquí como reactivo rico en plaquetas, puede variar de modo relativamente brusco en su velocidad de aglomeración, los resultados de los plasmas de pacientes fueron normalizados formando el cociente ("proporción") del acumulado de plasma de paciente/plasma normal (figuras 2 y 3). El cociente normalizado (proporción) de las pruebas de donantes con síndrome de antifosfolípido es marcadamente superior que el de los donantes normales que se encuentra casi en 1 (tabla 1).

Los resultados en representan en las figuras 1 a 3.

25 Tabla 1

Reactivo PRP	Activador	Muestra normal	Muestras de donantes con síndrome de antifosfolípido			
B	Epinefrina	1.18	1.48	1.66	1.60	1.65
C	ADP	0.88	1.34	1.45	1.35	1.24

Ejemplo 2: Medición de la acción abreviadora de tiempo de clausura en el analizador de función de plaqueta (Platelet Function Analyzer) de los anticuerpos de antifosfolípido en plasma de pacientes

30 Con ayuda del sistema analizador de función de plaqueta (Platelet Function Analyzer System) (PFA-100®, PFA-200, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH) habitualmente se mide en las muestras de sangre entera la hemostasis primaria en condiciones de flujo y, por lo tanto, en presencia de altas fuerzas de corte. Como medida para la función de los trombocitos, en este sistema se mide el tiempo (tiempo de clausura) que se necesita hasta la clausura de una abertura de membrana en una celda de medición especial. Los tiempos de clausura prolongados indican la presencia de una disfunción de plaquetas en el sentido de una capacidad reducida de aglomeración. Los tiempos de clausura abreviados indican la presencia de una disfunción de plaqueta en el sentido de una capacidad incrementada de aglomeración.

Como plasma de pacientes se empleó un acumulado de plasma de varios plasmas de pacientes con síndrome de antifosfolípido (acumulado de plasma de lupus con un valor de proporción LA1/LA2 de 2,53) y acumulado de plasma normal (plasma de control N, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH).

40 Como reactivo que contenía plaquetas se utilizó sangre entera fresca de donantes de sangre evidentemente sanos. Se prepararon 4 reactivos que contenían plaquetas (1, 2, 3, 4) a partir de sangre entera de 4 donantes diferentes.

45 El reactivo que contenía plaquetas a partir de sangre entera fresca se mezcló con 10% (v/v) del plasma de pacientes y se incubó por 10 minutos. Después, la mezcla de ensayo se puso en una celda de medición PFA con una pipeta, y dicha celda de medición estaba equipada con una membrana recubierta con colágeno (Col) y con ADP (Col/ADP), y se midió el tiempo de clausura (s) en un analizador de función de plaqueta (Platelet Function Analyzer).

El acumulado de plasma de varios plasmas de pacientes con síndrome de antifosfolípido (acumulado de plasma de lupus) mostró tiempos de clausura abreviados frente al acumulado de plasma normal (véase figura 4).

REIVINDICACIONES

1. Método de criba para identificar una muestra que contiene con alta probabilidad anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos, en cuyo caso el método presenta los siguientes pasos:

a) mezclar una muestra de un paciente con un reactivo que contiene plaqueta para producir una mezcla de ensayo,

5 b) adicionar un activador de plaquetas a la mezcla de ensayo, y

c) medir la aglomeración de plaquetas en la mezcla de ensayos,

en cuyo caso una aglomeración de plaquetas aumentada frente a la normal en la mezcla de ensayo indica la presencia de anticuerpos de antifosfolípido protrombóticos en la muestra del paciente.

10 2. Método según la reivindicación 1, en el cual la muestra del paciente se compone de plasma rico en plaquetas, plasma pobre en plaquetas, suero o sangre entera.

3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual el reactivo que contiene plaqueta se compone de una suspensión de plaquetas aisladas en una solución de búfer, de plasma rico en plaquetas o sangre entera.

15 4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual se adiciona un activador de plaquetas del grupo de ADP, colágeno, epinefrina, ácido araquidónico y trombina a la mezcla de ensayo.

5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en cuyo caso se mide de modo turbidimétrico la aglomeración de plaquetas en la mezcla de ensayo.

6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en cuyo caso la aglomeración de plaquetas se mide de modo nefelométrico en la mezcla de ensayo.

20 7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en cuyo caso la aglomeración de plaquetas se mide en la mezcla de ensayo

i) haciendo pasar la mezcla de ensayo a través de un capilar y a continuación a través de una abertura de un elemento de separación,

y

25 ii) midiendo el tiempo que se necesita para la formación de un coágulo de trombocitos en la abertura del elemento de separación hasta la clausura de la abertura.

8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual se mide la velocidad de la aglomeración de plaquetas en la mezcla de ensayo, preferiblemente dentro del período de tiempo de 12 a 50 segundos después de adicionar un activador de plaquetas a la mezcla de ensayo.

30 9. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual se mide la velocidad máxima de aglomeración de plaquetas.

35 10. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual se mide la aglomeración normal de plaquetas en una segunda mezcla de ensayo, en la cual una muestra normal está mezclada con el reactivo que contiene plaquetas para dar una mezcla de ensayo y en cuyo caso se establece la proporción, medida en la mezcla de ensayo en el paso c), de aglomeración de plaquetas a la aglomeración de plaquetas normal, y una proporción mayor a 1.0 indica la presencia de anticuerpos de antifosfolípido en la muestra de paciente.

FIG 1

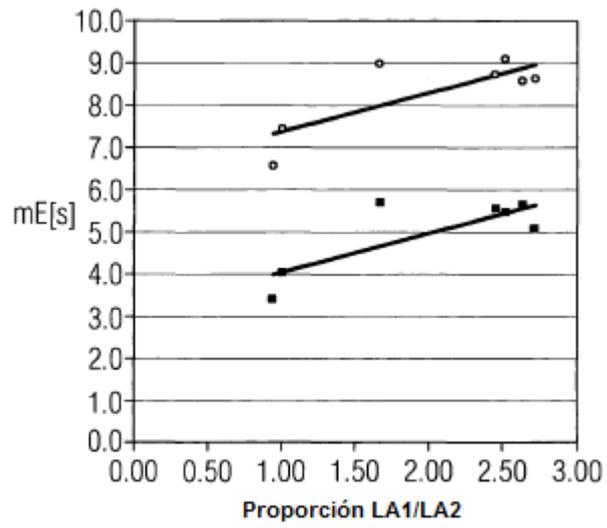


FIG 2

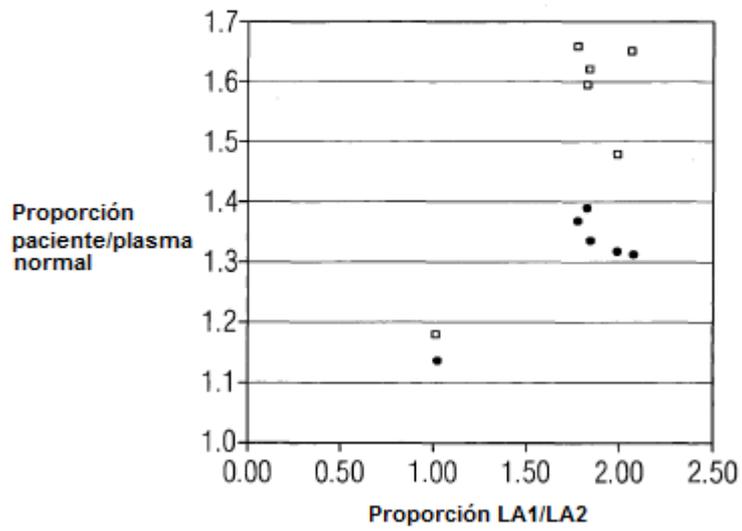


FIG 3

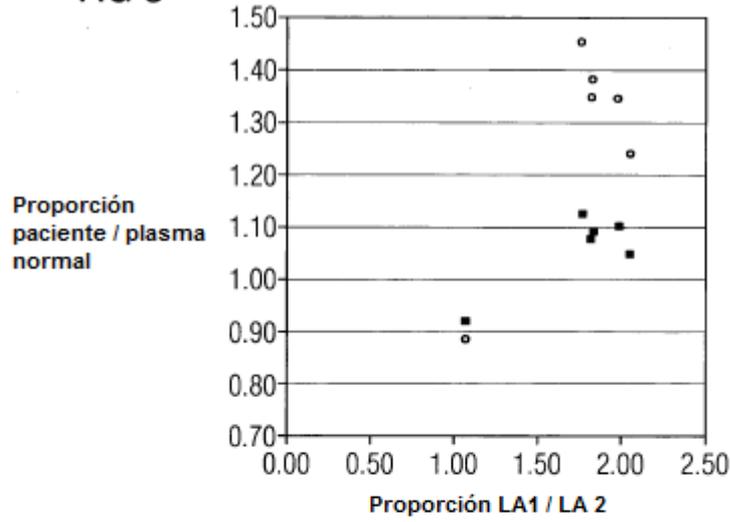


FIG 4

