

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 726**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2012 E 12184775 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2708892**

54 Título: **Procedimiento para determinar analitos asociados a plaquetas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.05.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PATZKE, JUERGEN, DR.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 535 726 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

Procedimiento para determinar analitos asociados a plaquetas

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico de coagulación y se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar analitos asociados a plaquetas en una muestra.

5 Los procesos fisiológicos, que por un lado garantizan la fluidez de la sangre en el sistema vascular y por otro lado garantizan que se eviten pérdidas de sangre extravasculares mediante la formación de coágulos de sangre, se engloban bajo el término hemostasia. En la regulación de la hemostasia participan un gran número de factores proteicos así como componentes celulares, tal como por ejemplo las plaquetas (sinónimos: plaquetas sanguíneas, trombocitos). En el caso de una lesión vascular, en primera lugar se produce la adhesión de plaquetas al colágeno subendotelial. Esta adhesión está mediada por proteínas de adhesión, tal como el factor de von Willebrand (VWF). Durante el proceso de adhesión se activan las plaquetas y se secretan mediadores fuera de sus gránulos, con lo que se induce la agregación de plaquetas adicionales así como un aumento de la activación. De esta manera tiene lugar una obstrucción primaria de las paredes vasculares (hemostasia primaria), que sólo se estabiliza mediante reacciones adicionales del sistema de coagulación plasmático (hemostasia secundaria). Una regulación errónea de estos procesos puede conducir a una propensión a la trombosis o a una propensión a la hemorragia y tener consecuencias potencialmente mortales según el grado de gravedad.

Las plaquetas contienen un gran número de componentes intracelulares, que tienen funciones fisiológicamente importantes. El sitio de almacenamiento más importante para diferentes sustancias, tal como por ejemplo factor plaquetario 4 (PF4), fibrinógeno, factor V, factor XIII, factor de von Willebrand (VWF), fibronectina, iones calcio así como factores de crecimiento plaquetario, tal como por ejemplo PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), son los gránulos alfa y los gránulos densos en el citoplasma de las plaquetas. Si las plaquetas se activan, por ejemplo como consecuencia de una lesión vascular, los componentes se secretan fuera de los gránulos, con lo que a su vez se ponen en marcha procesos importantes para el curso de la reacción de coagulación. Otras sustancias, tal como por ejemplo el factor XIII, se encuentran en el citosol de las plaquetas. A su vez, otras sustancias están unidas a o sobre la membrana celular de las plaquetas, en particular proteínas receptoras tales como el receptor de ADP, el receptor de tromboxano, el receptor de trombina o las glicoproteínas Ia, Ib, IIb y IIIa. Además, muchas proteínas, tal como por ejemplo factor X, factor IX y factor VIII, se unen como consecuencia de la activación plaquetaria a la membrana celular de las plaquetas. El VWF se une como consecuencia de estrés de cizallamiento o debido a defectos moleculares espontáneamente al receptor GPIIb de las plaquetas. Para la proteasa que rompe el VWF, ADAMTS-13, se conoce también un analito asociado a plaquetas.

Muchas de estas sustancias asociadas a plaquetas y su liberación regulada desempeñan un papel importante en la hemostasia. Esto también resulta evidente porque se conocen una serie de cuadros clínicos, que son atribuibles a una alteración de la función de los gránulos en las plaquetas. Una enfermedad conocida es el denominado síndrome de las plaquetas grises (GPS), un trastorno sanguíneo hereditario provocado por gránulos alfa disminuidos o ausentes. Otra enfermedad conocida es el denominado trastorno plaquetario de Quebec (QPD), también un trastorno sanguíneo hereditario, que está provocado por una excesiva degradación de componentes granulares alfa. Por tanto, la identificación de deficiencias o disfunciones de sustancias asociadas a plaquetas o la identificación de defectos en la secreción de estas sustancias fuera de los gránulos de las plaquetas tiene una importancia diagnóstica elevada.

Otra enfermedad conocida es el denominado síndrome de von Willebrand (enfermedad de von Willebrand, VWD), un trastorno sanguíneo hereditario o adquirido. Dado que el síndrome de von Willebrand puede estar provocado por diferentes alteraciones del VWF, se diferencian varios tipos. En el VWD tipo 3 el antígeno del VWF (VWF:Ag) está completamente ausente tanto en el plasma como en los gránulos alfa de las plaquetas. En el VWD de tipo 1, del que es característica una concentración plasmática de antígeno del VWF reducida, se diferencian dos subtipos que se diferencian porque en un subtipo la concentración de antígeno del VWF de los gránulos alfa en las plaquetas también está reducida, mientras que en el otro subtipo la concentración de antígeno del VWF de los gránulos alfa en las plaquetas es normal.

Dado que en los diferentes tipos del síndrome de von Willebrand se utilizan diferentes terapias, cada caso individual requiere una clasificación lo más exacta posible. Por tanto, es deseable determinar no sólo la concentración o la actividad de antígeno del VWF en el plasma de un paciente, sino también la concentración o la actividad de antígeno del VWF en las plaquetas del paciente.

Los procedimientos conocidos para determinar sustancias asociadas a plaquetas son técnicamente complejos y no son adecuados para una ejecución rutinaria en el laboratorio clínico. Básicamente resulta problemático que muchas sustancias asociadas a plaquetas relevantes desde el punto de vista del diagnóstico, tal como por ejemplo el VWF, no se encuentran exclusivamente en las plaquetas, sino también en el plasma. Habitualmente, para el análisis de analitos de plaquetas intracelulares se producen lisados plaquetarios a partir de plaquetas lavadas nuevas. Para ello se suspende varias veces plasma rico en plaquetas para separar los componentes plaquetarios en una disolución de

lavado, se centrifuga y a continuación se lisan las plaquetas mediante la adición de un tampón que contiene detergente. En el lisado plaquetario libre de plasma así obtenido se determina entonces la cantidad o la actividad de un analito deseado.

5 De Romeuf y Mazurier describen un procedimiento simplificado para determinar el VWF de plaquetas, en el que se prescinde al menos de las etapas de lavado. El procedimiento simplificado consiste en que se centrifuga sólo una vez plasma rico en plaquetas, se retira cuidadosamente el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en un tampón que contiene detergente. En el lisado plaquetario así obtenido se determina entonces la cantidad o la actividad el VWF de plaquetas (De Romeuf, C. y Mazurier, C. Interest of a simple and fast method for platelet von Willebrand factor characterization. *Thrombosis Research* 1996, 83(4): 287-298).

10 Este procedimiento simplificado tampoco es adecuado para una ejecución rutinaria en el laboratorio clínico y en particular tampoco para realizar la prueba de manera automática, dado que la preparación de las muestras todavía requiere que tenga que centrifugarse el material de muestra (plasma rico en plaquetas) y retirarse cuidadosamente el sobrenadante. Al menos en el campo de los analizadores de coagulación automáticos no se conocen sistemas que puedan centrifugar una muestra y retirar de manera precisa el sobrenadante de un sedimento celular.

15 Rodeghiero, F. *et al.* describen un procedimiento para determinar el VWF de plaquetas en lisados plaquetarios, obtenidos mediante la lisis de las plaquetas mediante la adición de detergente o glicerol (Rodeghiero, F. *et al.*, Platelet von Willebrand factor assay: results using two methods for platelet lysis. *Thrombosis Research* 1990, 59: 259-267).

20 Thuy, L.P. *et al.* describen un procedimiento para determinar la actividad del receptor plaquetario para VWF bovino en extractos plaquetarios humanos, obtenidos igualmente mediante la adición de detergente (Thuy, L.P. *et al.*, Identification of platelet receptors for bovine von Willebrand factor on human platelets by a new platelet receptor test. *Biochimica et Biophysica Acta* 1981, 678: 187-193).

25 Por tanto, la presente invención se basó en el objetivo de proporcionar un procedimiento para determinar la cantidad o la actividad de un analito asociado a plaquetas en una muestra, que prescinda de una preparación de muestras compleja, en particular de etapas de centrifugación y de lavado adicionales, y que sea adecuado para una ejecución rutinaria en el laboratorio clínico y en particular para su ejecución en un sistema de prueba automatizado.

El objetivo se soluciona realizando un procedimiento con las siguientes etapas:

- a) proporcionar una primera mezcla básica de prueba que contiene plasma rico en plaquetas de un individuo y un detergente,
- 30 b) proporcionar una segunda mezcla básica de prueba que contiene o bien
  - i) plasma rico en plaquetas del individuo y ningún detergente o bien
  - ii) plasma pobre en plaquetas del individuo y ningún detergente o bien
  - iii) plasma pobre en plaquetas del individuo y un detergente,
- c) medir la cantidad o la actividad del analito en la primera y en la segunda mezcla básica de prueba y
- 35 d) comparar los resultados de medición,

correspondiendo la diferencia entre los resultados de medición a la cantidad o a la actividad del analito asociado a plaquetas.

40 El término "analito asociado a plaquetas" debe entenderse en sentido amplio y comprende tanto componentes intracelulares de plaquetas, tal como por ejemplo componentes de los gránulos plaquetarios o del citosol, sustancias extracelulares, que se adhieren a la superficie externa de las plaquetas, tal como por ejemplo VWF o fibrinógeno, como componentes de membrana, que están anclados en la membrana celular de las plaquetas, tal como por ejemplo receptores transmembrana. El término "analito asociado a plaquetas" comprende todos los tipos de sustancias, tal como por ejemplo péptidos, proteínas (por ejemplo factor XIII, VWF, receptor GPIb, fibrinógeno, dímero D), lípidos, iones (por ejemplo iones calcio), nucleótidos (por ejemplo ADP y ATP), ácidos nucleicos (por

45 ejemplo ADN, ARN y miARN) y polifosfato de cadena larga (n > 50), que están contenidas en plaquetas aisladas, preferiblemente humanas.

El término "plasma rico en plaquetas" (PRP) comprende una muestra de plasma de un individuo, preferiblemente

una muestra de plasma de un individuo humano, que contiene al menos 10.000 plaquetas por microlitro [ $\mu$ l] de muestra. El experto en la técnica conoce diversos procedimientos para obtener plasma rico en plaquetas a partir de una muestra de sangre completa. Un procedimiento habitual funciona de la siguiente manera: se centrifuga una muestra de sangre completa anticoagulada a 170 g durante 15 minutos o a 180 g durante 10 minutos. De este modo se consigue que se forme una fase inferior de glóbulos rojos y blancos y por encima de la misma una fase de plasma rico en plaquetas. Esta última se retira con cuidado sin que se mezcle con la fase inferior.

Por el contrario, el plasma pobre en plaquetas (PPP), que es al que se hace referencia habitualmente cuando se usa el término "plasma", está de manera ideal libre de plaquetas, pero debe contener en cualquiera caso menos de 10.000 plaquetas por microlitro [ $\mu$ l] de muestra. El experto en la técnica conoce diversos procedimientos para obtener plasma pobre en plaquetas a partir de una muestra de sangre completa. Un procedimiento habitual funciona de la siguiente manera: se centrifuga una muestra de sangre completa anticoagulada a 1500 g durante al menos 15 minutos. De este modo se consigue que se forme una fase inferior de glóbulos rojos y blancos y de plaquetas y por encima de la misma una fase de plasma pobre en plaquetas. Esta última se retira con cuidado sin que se mezcle con la fase inferior.

El término "detergente" comprende sustancias tensioactivas, en particular tensioactivos no iónicos, que tienen la capacidad de aumentar la solubilidad de membranas lipídicas celulares en un medio acuoso. Como es sabido, los detergentes permeabilizan las membranas celulares, de modo que se emiten componentes intracelulares o componentes transmembrana al medio circundante o son más fácilmente accesibles para parejas de unión, que se usan para la detección de los componentes celulares. Detergentes adecuados para la permeabilización de membranas lipídicas celulares o para la lisis de células, tal como por ejemplo también de plaquetas, son por ejemplo [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil] éter de polietilenglicol (nombre comercial TRITON® X-100), monolaurato de sorbitano-polioxi-etileno (20) (nombre comercial TWEEN® 20), polidocanol (nombre comercial THESIT®, sinónimos: dodecil éter de polietilenglicol, dodecil éter de polietilenglicol 400), glicerina, saponina, digitonina, filipina, octilglucósido, dodecilsulfato, Zonyl® y desoxicolato.

El procedimiento según la invención para determinar la cantidad o la actividad de un analito asociado a plaquetas en una muestra de un individuo comprende proporcionar una primera mezcla básica de prueba que contiene plasma rico en plaquetas del individuo y un detergente. Preferiblemente, al plasma rico en plaquetas se le añade el detergente en una cantidad tal que el detergente esté contenido en la mezcla básica de prueba en un porcentaje en volumen de desde el 0,1 hasta el 1,6%, de manera especialmente preferible de desde el 0,2 hasta el 0,8%. Mediante la adición de reactivos de detección específicos de analito, tal como por ejemplo parejas de unión marcadas, con especificidad para el analito que debe detectarse, puede determinarse la cantidad o la actividad del analito en la mezcla básica de prueba. La cantidad o actividad del analito determinada en la primera mezcla básica de prueba corresponde a la suma de la cantidad o actividad del analito que está presente en el plasma (porcentaje en plasma) y de la cantidad o actividad del mismo analito que está presente en o sobre las plaquetas (porcentaje en plaquetas).

El procedimiento según la invención comprende además proporcionar una segunda mezcla básica de prueba que contiene o bien

i) plasma rico en plaquetas del individuo y ningún detergente o bien

ii) plasma pobre en plaquetas del individuo y ningún detergente o bien

iii) plasma pobre en plaquetas del individuo y un detergente.

Preferiblemente, en la alternativa iii) al plasma pobre en plaquetas se le añade el detergente en una cantidad tal que el detergente esté contenido en una concentración final con un porcentaje en volumen de desde el 0,1 hasta el 1,6%, de manera especialmente preferible en un porcentaje en volumen de desde el 0,2 hasta el 0,8% en la mezcla básica de prueba. De manera especialmente preferible, en la alternativa iii) al plasma pobre en plaquetas se le añade el detergente en una cantidad, de modo que el detergente esté contenido en la misma concentración final que en la primera mezcla básica de prueba. Mediante la adición de los mismos reactivos de detección específicos de analito que en la primera mezcla básica de prueba, tal como por ejemplo parejas de unión marcadas, con especificidad para el analito que debe detectarse, puede determinarse la cantidad o la actividad del analito en la segunda mezcla básica de prueba. La cantidad o actividad del analito determinada en la segunda mezcla básica de prueba corresponde a la cantidad o actividad del analito que está presente en el plasma (analito plasmático). No se determina la cantidad o actividad del mismo analito que está presente en las plaquetas (analito asociado a plaquetas), o bien porque no se usa ningún detergente que haría accesible el porcentaje en plaquetas del analito (alternativa i) o bien porque sólo se usa plasma pobre en plaquetas que no contiene una cantidad suficiente de plaquetas (alternativas ii y iii).

El procedimiento según la invención comprende además comparar los resultados de medición, es decir, comparar el resultado de medición para la primera mezcla básica de prueba (cantidad o actividad del analito plasmático y del

asociado a plaquetas) con el resultado de medición para la segunda mezcla básica de prueba (cantidad o actividad del analito plasmático). La diferencia entre los resultados de medición corresponde a la cantidad o a la actividad del analito asociado a plaquetas. Así puede determinarse, por ejemplo restando el resultado de medición para la segunda mezcla básica de prueba del resultado de medición para la primera mezcla básica de prueba, la cantidad o actividad del analito asociado a plaquetas.

La medición de la cantidad o actividad del analito en la primera y la segunda mezcla básica de prueba puede tener lugar con ayuda de cualquiera método de detección que sea adecuado para detectar el analito.

La medición de la cantidad o actividad del analito puede tener lugar, por ejemplo, en una prueba de unión heterogénea. Las pruebas de unión heterogéneas se caracterizan por una o varias etapas de separación y/o etapas de lavado. La separación puede tener lugar, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación, precipitación con sustancias tales como polietilenglicol o sulfato de amonio, filtración, separación magnética, unión a una fase sólida. Una fase sólida de este tipo está compuesta por material poroso y/o no poroso, por regla general insoluble en agua. Puede presentar las más diversas formas, tales como por ejemplo: recipiente, tubo, placa de microtitulación, esfera, micropartícula, varilla, banda, papel de filtro o de cromatografía, etc. En las pruebas de unión heterogéneas en formato intercalado (tipo sándwich), por regla general una primera pareja de unión específica de analito, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de anticuerpo que se une a analito o un oligonucleótido, está unida a una fase sólida y sirve para separar el complejo de unión analito/pareja de unión específica de analito de la fase líquida, mientras que una segunda pareja de unión específica de analito porta para la detección del complejo de unión un marcador detectable (por ejemplo una enzima, un marcador de fluorescencia o quimioluminiscencia, etc.). Estos procedimientos de prueba se dividen adicionalmente en denominadas pruebas de tipo sándwich de una etapa, en las que las dos parejas de unión específicas se incuban simultáneamente con la muestra, y en pruebas de tipo sándwich de dos etapas, en las que la muestra se incuba en primer lugar con el reactivo de fase sólida y tras una etapa de separación y lavado se incuba el complejo de unión unido a la fase sólida, formado por analito y pareja de unión específica de analito, con el reactivo de detección. Un ejemplo clásico de una prueba de unión heterogénea es la prueba ELISA.

La medición de la cantidad o actividad del analito también puede tener lugar en una prueba de unión homogénea. En las pruebas de unión homogéneas no tiene lugar una separación de las parejas de unión específicas de analito unidas y libres. La mezcla básica de prueba, que contiene las parejas de unión específicas de analito, los componentes que forman señales y la muestra, se mide tras o incluso durante la reacción de unión sin una etapa de separación o de lavado adicional y se determina la señal de medición correspondiente. Ejemplos de inmunoensayos homogéneos son muchos métodos turbidimétricos o nefelométricos, pudiendo las parejas de unión específicas de analito usadas para la detección estar asociadas con partículas de látex. Ejemplos de formatos de prueba homogéneos son pruebas EMIT<sup>®</sup>, pruebas CEDIA<sup>®</sup>; inmunoensayos de polarización fluorescente, inmunoensayos de canalización de oxígeno luminiscentes ("LOCI", véase el documento EP-A2-515194), T2MR (T2 Biosystems, Inc., véase el documento US-A1-20120164644), etc. En un inmunoensayo de tipo sándwich homogéneo, tal como por ejemplo una prueba de látex nefelométrica, las parejas de unión, por ejemplo anticuerpos monoclonales o policlonales o un fragmento de anticuerpo que se une a analito o un oligonucleótido, se incuban junto con la muestra y la medición de la señal se realiza durante y/o tras la incubación, sin que se realice una etapa de separación o de lavado antes de la medición.

En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, la medición de la cantidad o actividad del analito en la primera y segunda mezcla básica de prueba tiene lugar con ayuda de una prueba de aglutinación de látex. Para ello, cada mezcla básica de prueba se mezcla con una fase sólida particulada, preferiblemente con partículas de látex que están asociadas con al menos una pareja de unión específica de analito, y se mide ópticamente la aglutinación de la fase sólida particulada. Alternativamente, cada mezcla básica de prueba se mezcla con partículas magnéticas, que tienen parejas de unión sobre la superficie, que en presencia del analito modifican la agregación de las partículas. La mezcla básica de reacción se expone a un campo magnético y la aglutinación de la fase sólida particulada se determina mediante la tasa de relajación T2 de la mezcla básica de reacción.

La medición de la cantidad o actividad del analito también puede tener lugar en una prueba de unión competitiva. En una prueba de unión competitiva el analito de la muestra y el analito del reactivo, por ejemplo un analito marcado, compiten por la unión a un número limitado de parejas de unión específicas de analito. Ejemplos para ilustrar el principio: (i) el analito de la muestra compite con el analito del reactivo, que está asociado con un componente de un sistema formador de señales, por la unión a parejas de unión específicas de analito asociado a fase sólida o (ii) el analito de la muestra compite con analito del reactivo asociado a fase sólida por la unión a parejas de unión específicas de analito que están asociadas con un componente de un sistema formador de señales.

En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, se mide la cantidad o la actividad de VWF asociado a plaquetas. La medición de la cantidad de antígeno del VWF (VWF:Ag) en una mezcla básica de prueba puede tener lugar con ayuda de una prueba de unión heterogénea u homogénea, en la que se usa al menos una pareja de unión específica de VWF, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de anticuerpo que se une a VWF. La medición de la actividad de VWF (VWF:Ac) en una mezcla básica de prueba

puede determinarse con ayuda de un ensayo de cofactor de ristocetina clásico (VWF:Rco). Para ello se mezcla la mezcla básica de prueba con ristocetina y plaquetas fijadas, y se determina la aglutinación de las plaquetas. Alternativamente, también puede determinarse la actividad de VWF mediante la capacidad de unión del VWF a GPIb. Para ello, la mezcla básica de prueba se mezcla o bien con ristocetina y proteína GPIb de tipo natural, normalmente recombinante, o un fragmento de proteína GPIb, que se une a una fase sólida (documento WO-A2-01/02853), o bien sin ristocetina pero con una proteína GPIb mutada, normalmente recombinante, o un fragmento de proteína GPIb, que se une a una fase sólida (documentos WO-A2-2009/007051, WO-A1-2009/026551), y se cuantifican la unión del VWF a la proteína GPIb. Alternativamente, la actividad de VWF también puede determinarse mediante la capacidad de unión del VWF a colágeno.

En otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención, se mide la cantidad o la actividad de factor XIII asociado a plaquetas. La medición de la cantidad de factor XIII en una mezcla básica de prueba puede tener lugar con ayuda de una prueba de unión heterogénea u homogénea, en la que se usa al menos una pareja de unión específica de factor XIII, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de anticuerpo que se une a factor XIII. La medición de la actividad de factor XIII en una mezcla básica de prueba puede determinarse con ayuda de una prueba en la que se activa el factor XIII en la mezcla básica de prueba con trombina en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  para dar el factor XIIIa. Entonces se mezcla la mezcla básica de prueba con un péptido sintético que contiene glutamina y con éster etílico de glicina, que sirven como sustratos para la formación de uniones amida intermoleculares mediante el factor XIIIa. Para determinar cuantitativamente el amoniaco liberado en esta reacción, la muestra se mezcla adicionalmente con NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido), NADPH o tio-NAD(P)H y con componentes de una reacción indicadora dependiente de NADH, concretamente con glutamato deshidrogenasa (GLDH) y  $\alpha$ -cetoglutarato. En presencia de amoniaco, la GLDH transforma el  $\alpha$ -cetoglutarato en glutamato. Esta reacción consume adicionalmente NADH, y se produce NAD<sup>+</sup>, la forma oxidada de NADH. El NAD<sup>+</sup> tiene un espectro de absorción distinto del de NADH, de modo que la absorción de la mezcla básica de prueba varía de manera proporcional al consumo de NADH y con ello de manera proporcional a la cantidad de amoniaco y con ello de manera proporcional a la cantidad o actividad de factor XIII (documentos EP-A2-336353; WO-A1-2011/042071).

En otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención, se mide la cantidad de dímero D asociado a plaquetas. La medición de la cantidad de dímero D en una mezcla básica de prueba puede tener lugar con ayuda de una prueba de unión heterogénea u homogénea, en la que se usa al menos una pareja de unión específica de dímero D, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de anticuerpo que se une a dímero D.

### Descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 es una representación esquemática de la actividad de factor XIII (en % con respecto al patrón) en muestras de plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas de 3 donantes sanos (donante 1, 2 y 3) según el ejemplo de realización 2. Las barras 1 - 4 muestran en cada caso los resultados de prueba para una muestra de plasma pobre en plaquetas (muestra de PPP). Las barras 5 - 8 muestran en cada caso los resultados de prueba para una muestra de plasma rico en plaquetas (muestra de PRP). Las barras 1 y 5 representan resultados de prueba que se determinaron en ausencia total de detergente. Las barras restantes representan resultados de prueba que se determinaron en presencia de detergente (Thesit) en la mezcla básica de prueba (2 y 6: pretratamiento de la muestra con Thesit/sin Thesit en los reactivos de prueba; 3 y 7: sin pretratamiento de la muestra con Thesit/Thesit en los reactivos de prueba; 4 y 8: pretratamiento de la muestra con Thesit y Thesit en los reactivos de prueba). Si se comparan la barra 5 (PRP como muestra y determinación de los resultados de prueba en ausencia de detergente) con las barras 6-8 (PRP como muestra y determinación de los resultados de prueba en presencia de detergente), se observa entonces que se mide una actividad de factor XIII esencialmente mayor, que es atribuible a la actividad de factor XIII asociado a plaquetas.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Determinación de la actividad de VWF asociado a plaquetas

##### Producción de plasma rico en plaquetas (PRP):

En cada caso se centrifugaron 10 ml de sangre completa con citrato nueva de cuatro donantes aparentemente sanos en los tubos de extracción originales a 180 g durante 10 minutos. Se retiró con cuidado el plasma rico en plaquetas en el sobrenadante con una pipeta y se conservó cerrado a temperatura ambiente.

##### Producción de plasma pobre en plaquetas (PPP):

Se centrifugó la fase inferior que quedó en los tubos de extracción, procedente de la producción del plasma rico en plaquetas, que contiene los glóbulos rojos y blancos, restos de trombocitos y plasma, a 2000 g durante 20 minutos. Se retiró con cuidado el sobrenadante transparente, es decir el plasma pobre en plaquetas, con una pipeta y se conservó cerrado a temperatura ambiente.

5 **Ejemplo 1.1: Prueba de cofactor de ristocetina para determinar la actividad de VWF de VWF asociado a plaquetas.**

Se usó como muestra el plasma rico en plaquetas y pobre en plaquetas descrito anteriormente de los cuatro donantes. Para la producción de una primera mezcla básica de prueba se mezclaron en cada caso 10 µl de muestra con 20 µl de una disolución de NaCl (0,9%) y 150 µl de un reactivo que contenía aproximadamente 1,2 millones de trombocitos fijados por µl, ristocetina (1,25 mg/ml) y un 0,75 por ciento en volumen de Thesit (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania), de modo que se obtuvo un porcentaje en volumen de Thesit en la mezcla básica de prueba del 0,63%. Para la producción de una segunda mezcla básica de prueba sin detergente se mezclaron 10 µl de muestra con 20 µl de disolución de NaCl (0,9%) y 150 µl de un reactivo que contenía aproximadamente 1,2 millones de trombocitos fijados por µl y ristocetina (1,25 mg/ml). Mediante una medición de la extinción se determinó la agregación plaquetaria en cada mezcla básica de prueba. La reacción de agregación se comporta de manera proporcional a la actividad de VWF de la muestra.

Se promediaron en cada caso las actividades de VWF determinadas (VWF:RCo en % con respecto al patrón) de las 4 muestras de plasma ricas en plaquetas y las 4 muestras de plasma pobres en plaquetas. En la tabla 1 se representan las actividades de promediadas ([%], % con respecto al patrón).

20 Tabla 1: Actividad VWF-RCo promediada (% con respecto al patrón) de plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas en ausencia y en presencia de un detergente (Thesit)

	VWF:RCo (%) en ausencia de Thesit	VWF:RCo (%) en presencia de Thesit
Plasma pobre en plaquetas (PPP)	89,8	95,6
Plasma rico en plaquetas (PRP)	95,5	121,8

Para determinar la actividad de VWF asociado a plaquetas ahora puede o bien

25 a) calcularse la diferencia entre la actividad de VWF que se determinó en plasma rico en plaquetas en presencia de detergente y la actividad de VWF que se determinó en plasma rico en plaquetas en ausencia de detergente, es decir, en este caso concreto:

$$121,8 \% - 95,5 \% = \underline{26,3 \%}$$

o bien

30 b) calcularse la diferencia entre la actividad de VWF que se determinó en plasma rico en plaquetas en presencia de detergente y la actividad de VWF que se determinó en plasma pobre en plaquetas en ausencia de detergente, es decir, en este caso concreto:

$$121,8 \% - 89,8 \% = \underline{32,0 \%}$$

o bien

35 c) calcularse la diferencia entre la actividad de VWF que se determinó en plasma rico en plaquetas en presencia de detergente y la actividad de VWF que se determinó en plasma pobre en plaquetas en presencia de detergente, es decir, en este caso concreto:

$$121,8 \% - 95,6 \% = \underline{26,2 \%}$$

La actividad de VWF así determinada para el VWF asociado a plaquetas en el intervalo de desde el 26,2 hasta el 32,0% (absoluto) es plausible para donantes sanos, dado que para el VWF de plaquetas en la bibliografía se indican valores del 10 - 25% con respecto al VWF total (McGrath, R.T. *et al.* Platelet von Willebrand factor - structure, function and biological importance. British Journal of Haematology 2010, 148, 834-843). La actividad de VWF aumentada en un 5,8% que se mide en plasma pobre en plaquetas en presencia de Thesit con respecto a la medición en ausencia de Thesit es mínima y es atribuible o bien a la imprecisión de la prueba o bien a una ligera influencia del detergente sobre el sistema de prueba.

**Ejemplo 1.2: Prueba de aglutinación de látex para determinar la actividad de VWF de VWF asociado a plaquetas.**

La prueba INNOVANCE® VWF Ac (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) es una prueba de aglutinación de látex para determinar la actividad de VWF en muestras de plasma. Se usó como muestra el plasma rico en plaquetas y pobre en plaquetas descrito anteriormente de los cuatro donantes. Para determinar la actividad de VWF se mezclaron en cada caso 15 µl de muestra, 30 µl de tampón veronal de Owren, 70 µl de tampón de reacción (que contenía entre otras cosas un porcentaje del 0,90% en volumen del detergente Thesit), 13 µl de reactivo GPIbα (disolución tampón que contenía proteína GPIbα aislada, que en ausencia de ristocetina se une a VWF) y 40 µl de reactivo de látex (disolución tampón que contiene partículas de látex, que están recubiertas con un anticuerpo anti-GPIbα monoclonal), y se determinó turbidimétricamente la aglutinación de partículas. Por consiguiente, en las mezclas básicas de prueba había un porcentaje en volumen del 0,38% de Thesit. En cada caso se promediaron las actividades de VWF determinadas (en % con respecto al patrón) de las 4 muestras de plasma rico en plaquetas y de las 4 muestras de plasma pobre en plaquetas. En la tabla 2 se representan las actividades de VWF promediadas ([%], % con respecto al patrón).

Tabla 2: Actividad de VWF promediada (% con respecto al patrón) de plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas en presencia de un detergente (Thesit)

	VWF (%) en presencia de Thesit
Plasma pobre en plaquetas (PPP)	102,9
Plasma rico en plaquetas (PRP)	121,8
VWF asociado a plaquetas	18,9

La diferencia entre la actividad de VWF que se determinó en plasma rico en plaquetas en presencia de detergente y la actividad de VWF que se determinó en plasma pobre en plaquetas en presencia de detergente, es decir, en este caso concreto:

$$121,8 \% - 102,9 \% = \underline{18,9 \%}$$

corresponde al VWF asociado a plaquetas.

**Ejemplo 2: Determinación de la actividad de factor XIII asociado a plaquetas**

Para determinar la actividad de F XIII se usó la prueba Berichrom® FXIII (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania). El F XIII contenido en la muestra se activa mediante la adición de trombina a la muestra para dar F XIIIa. La fibrina formada por trombina también acelera esta reacción. El fibrinógeno no se elimina antes de la medición, dado que esto va asociado a una pérdida de F XIII. En lugar de ello, mediante fibrina formada por la acción de la trombina mediante un péptido que inhibe la agregación se impide la formación de un coágulo y se mantiene en disolución. El F XIIIa se une a un sustrato peptídico específico con etil éster de glicina liberando amoniaco. Éste se determina en una reacción enzimática que transcurre en paralelo. Se mide la disminución de NADH a través de la extinción a 340 nm. Cuando los resultados se encontraban por encima del intervalo de medición inicial, se realizó una dilución previa 1:2 de la muestra en un tampón fosfato y se midió de nuevo.

Se usó como muestra el plasma rico en plaquetas y pobre en plaquetas descrito anteriormente de tres donantes sanos. Se mezclaron en cada caso 15 µl de muestra con 75 µl de reactivo activador Berichrom FXIII (que contenía entre otras cosas trombina y con un 1,49 por ciento en volumen de Thesit o sin Thesit) y se incubaron. Después se inició la reacción colorimétrica con 75 µl del reactivo de detección Berichrom FXIII (que contenía entre otras cosas GLDH (20 UI/ml), un sustrato peptídico sintético de F XIII (2,4 g/l), ADP, etil éster de glicina (1,4 g/l) y α-cetoglutarato



(2,7 g/l)). Por consiguiente se obtuvo un porcentaje en volumen del 0,68% de Thesit en la mezcla básica de prueba.

En un experimento adicional se pretrataron las muestras con detergente. Para ello se incubaron las muestras en presencia de un porcentaje en volumen del 0,63% de Thesit durante 30 minutos a 37°C, antes de mezclarse con los reactivos para determinar la actividad de factor XIII.

- 5 En la figura 1 se representan las actividades de factor XIII determinadas (en % con respecto al patrón) de las muestras de plasma rico en plaquetas y las muestras de plasma pobre en plaquetas de los 3 donantes.

10 La actividad de factor XIII de la muestra de PPP de un donante (independientemente de con qué mezcla básica de prueba se determinó la actividad) y la actividad de factor XIII de la muestra de PRP de un donante en ausencia de detergente son en cada caso muy similares. Esto demuestra que ni la presencia de detergente ni el pretratamiento con detergente y ni tampoco la presencia de trombocitos en la mezcla básica de prueba alteran la prueba de factor XIII. Tanto con el pretratamiento de una muestra de PRP con detergente como con el uso de detergente en un reactivo de prueba (resumiendo: siempre que se realiza el procedimiento de prueba en presencia de detergente) se libera en el plasma rico en plaquetas una gran cantidad de factor XIII asociado a plaquetas. Esto muestra que el procedimiento según la invención detecta toda la cantidad de factor XIII asociado a plaquetas que puede liberarse además del factor XIII en plasma.

15 El porcentaje de factor XIII asociado a plaquetas puede determinarse calculando la diferencia entre la cantidad total y el porcentaje en plasma. De este modo se obtienen para las 3 muestras medidas los valores según la tabla 3 para el porcentaje de factor XIII asociado a plaquetas.

20 Tabla 3: Actividades de factor XIII (% con respecto al patrón) de factor XIII asociado a plaquetas mediante el cálculo de la diferencia entre los valores de medición de una primera mezcla básica y diversas segundas mezclas básicas alternativas

	Factor XIII total (%)		
	Donante 1	Donante 2	Donante 3
PRP como muestra, prueba con detergente	181,6	217,4	312,6
factor XIII asociado a plaquetas (%)			
	Donante 1	Donante 2	Donante 3
Plasma (PPP) como muestra, prueba sin detergente	97,8	112,7	173,7
Plasma (PPP) como muestra, prueba con detergente	98,2	101,2	169,3
PRP como muestra (PPP), prueba sin detergente	87,2	99,7	161,0

El contenido en factor XIII asociado a plaquetas es considerablemente mayor en el donante n.º 3 que en los donantes n.ºs 1 y 2.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para determinar la cantidad o la actividad de un analito asociado a plaquetas en una muestra de un individuo, caracterizado porque el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 5 a) medir la cantidad o la actividad del analito en una primera mezcla básica de prueba que contiene plasma rico en plaquetas del individuo y un detergente y en una segunda mezcla básica de prueba que contiene o bien
- i) plasma rico en plaquetas del individuo y ningún detergente o bien
- ii) plasma pobre en plaquetas del individuo y ningún detergente o bien
- iii) plasma pobre en plaquetas del individuo y un detergente, y
- b) comparar los resultados de medición,
- 10 correspondiendo la diferencia entre los resultados de medición a la cantidad o a la actividad del analito asociado a plaquetas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el detergente es un tensioactivo no iónico, preferiblemente del grupo de [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil] éter de polietilenglicol (TRITON X-100), monolaurato de sorbitano-polioxietileno (20) (TWEEN 20) y polidocanol (THESIT).
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el detergente está contenido en la mezcla básica de prueba en una concentración final con un porcentaje en volumen de desde el 0,1 hasta el 1,6%, preferiblemente en una concentración final con un porcentaje en volumen de desde el 0,2 hasta el 0,8% en la mezcla básica de prueba.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición de la cantidad o la actividad del analito en la primera y en la segunda mezcla básica de prueba tiene lugar mezclando cada mezcla básica de prueba con una fase sólida particulada, preferiblemente con partículas de látex, que están asociadas con al menos una pareja de unión específica de analito y en el que se mide la aglutinación de la fase sólida particulada.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores para determinar la cantidad o la actividad de un analito asociado a plaquetas del grupo de factor de von Willebrand, factor XIII, dímero D, fibrinógeno y polifosfato.

