

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 461**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/36** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/IL2011/000911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12077097**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11804825 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2649457**

54 Título: **Inmunoensayo para detección trombina**

30 Prioridad:

**09.12.2010 IL 20992110**  
**09.12.2010 US 421339 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.12.2016**

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)**  
**Bldg. 14 Weizmann Science Park P.O. Box 619**  
**Rehovot 76106, IL**

72 Inventor/es:

**MINTZ, RONI;**  
**ORR, NADAV y**  
**NUR, ISRAËL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 593 461 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

Inmunoensayo para detección trombina

5 **ÁREA DEL INVENTO**

El invento se refiere a un inmunoensayo para cuantificar la trombina en una muestra que comprende a anti-combina III (AT-III).

10 **ANTECEDENTES DEL INVENTO**

La trombina ( $\alpha$ -trombina) es una serina proteasa endolítica que juega un papel importante en el proceso de coagulación o en la formación de trombos. La trombina es producida mediante la división enzimática de la protrombina de zimógeno. La división es ejecutada por el factor activado X (factor Xa). La trombina humana está compuesta de una cadena ligera (que tiene una masa molecular de aproximadamente 6 kDa) y una cadena pesada (que tiene una masa molecular de aproximadamente 31 kDa). La trombina comprende a un lugar activo que está ubicado dentro de la cadena pesada. La trombina tiene una especificidad alta para sustratos proteínicos que tiene enlaces de arginina y su sustrato principal es el fibrinógeno. La trombina se enlaza al fibrinógeno y lo convierte en fibrina. La trombina también activa a la proteína C, a plaquetas, al factor XIII y a la procarboxipeptidasa B (TAFI).

20 Normalmente, la actividad de la trombina es inhibida en el plasma. El inhibidor principal de la trombina que se encuentra en el plasma es la anti-trombina III (AT-III) y en una menor magnitud al cofactor de heparina II. La tasa de inhibición de ambos de estos inhibidores es incrementada en gran medida en la presencia de concentraciones óptimas de heparina. Otros inhibidores fisiológicos de la trombina son la ~~alpha~~2-croglbulina, y  $\alpha$ 1-antitripsina 1-4. La AT-III inhibe el proceso de coagulación al enlazar a la trombina y al factor Xa. La actividad inhibitoria de la AT-III es incrementada notoriamente por la presencia de heparina. La concentración normal de anti-trombina III en el plasma de la sangre humana es alta y es de aproximadamente 0.12 miligramos/mililitro. La desactivación de la trombina ocurre como un resultado de atrapar a la trombina en un complejo estimular con la AT-III. La formación del complejo evita la accesibilidad del lugar activo de la trombina para su sustrato. La formación de un complejo de anti-trombina III - trombina involucra una interacción entre la trombina y un enlace específico de péptidos reactivos dentro de la AT-III. En la AT-III humana este enlace es entre la arginina (arg) 393 y la serina (ser) 394.

Niveles anormalmente altos de trombina en la circulación podrían activar al proceso de coagulación, lo cual resulta, consecuentemente, en una coagulopatía generalizada. Un método que permite una determinación rápida y cuantitativa de los niveles de trombina en una muestra biológica examinada, por ejemplo, una muestra de sangre, es de un interés biomédico considerable. Un análisis rápido y cuantitativo de la trombina en el plasma de modelos humanos y animales también podría ser de alta importancia para evaluaciones de seguridad de uso experimental y rutinario de hemostáticos que incluyen a la trombina.

La detección de la trombina en inmunoensayos utilizando a anticuerpos específicos de la trombina, en condiciones de cantidades relativamente grandes de la protrombina pro-enzimática, tales como en una muestra de plasma, podría resultar difícil.

US4753875 presenta un método para realizar ensayos de trombina, en los cuales un exceso de un inhibidor marcado de trombina (por ejemplo, hirudina marcada o AT-III marcada) se mezcla en una solución con una muestra probada que contiene a la trombina para formar una mezcla de un complejo de inhibidor marcado-trombina y un inhibidor sin marcaciones. Después de eso, un anticuerpo anti-trombina es agregado para formar complejos del inhibidor marcado-trombina y el anticuerpo específico de la trombina. Los complejos son separados entonces del inhibidor sin marcaciones y la marcación es medida. Se usa como ejemplo a un ensayo para examinar a la trombina en una muestra de plasma al agregar 3H-hirudina y separar el complejo de trombina-hirudina con anticuerpos específicos de la trombina acoplados a celulosa. Por lo tanto, esta prueba requiere un paso complejo de separación, por ejemplo, usando un paso adicional de separación de afinidad mediante cromatografía de columnas.

US5296352 y EP0479721A2 presenta anticuerpos monoclonales que son dirigidos hacia, y, que reconocen, a complejos de trombina/hirudina y a sus derivados. US5296352 y EP0479721A2 presentan el uso de anticuerpos monoclonales para la detección de complejos de trombina/hirudina. También se declaró que los anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados para detectar montos pequeños de trombina generada espontáneamente en un sujeto. El método incluye inyectar hirudina al sujeto como un rastreador seguido por la medición del complejo trombina/hirudina formado con la ayuda de los anticuerpos monodonales que reconocen al complejo. Se muestra como ejemplo a un ensayo ELISA para la determinación del complejo trombina-hirudina que se encuentra presente en el plasma. Esta prueba requiere la inyección de hirudina al sujeto para examinar y detectar a la trombina. Existe una necesidad para una prueba in vitro, fácil, rápida y efectiva para determinar los niveles de trombina en una muestra de sangre.

65 **RESUMEN DEL INVENTO**

El invento suministra un método in vitro para reducir la interferencia de la anti-trombina III (AT-III) en un

5 inmuensayo para cuantificar a la trombina en una muestra en la presencia de anti-trombina III (AT-III), donde el inmuensayo comprende los pasos de: contactar a la muestra con una molécula pequeña seleccionada de un grupo que consiste de hirudina que ocurre naturalmente, variaciones de hirudina sintética, derivados de hirudina, variaciones recombinantes de hirudina, miméticos, y una de sus combinaciones que reconocen al lugar de enlace de sustratos de la trombina; agregar a la muestra a un anticuerpo polidonal específico de trombina o a uno de sus fragmentos, donde el anticuerpo específico de trombina es elevado en contra de una trombina que tiene a un lugar activo bloqueado por una molécula seleccionada de un grupo que consiste de Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK - Phe-Pro-Arg-chloromethylketone), ácido 4-aminofenilpirúvico (APPA - aminophenylpyruvic acid), fluoruro de bencenosulfonilo de 4-(2-aminoetilo) (AEBSF - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride), y una de sus combinaciones; que comprende además a (a) medir los enlaces del anticuerpo a la trombina y determinar el monto de trombina presente; o (b) medir el nivel de anticuerpos enlazados, donde la tasa de moles entre la hirudina y la trombina en la muestra es más alta o igual a 0.64, donde la interferencia de AT-III en el inmuensayo es reducida en comparación a un inmuensayo de control realizado en la ausencia de la molécula pequeña.

15 El invento suministra un botiquín para cuantificar a la trombina en una muestra que comprende a anti-trombina III (AT-III), donde el botiquín comprende a: un anticuerpo polidonal específico de la trombina o uno de sus fragmentos; y una molécula pequeña seleccionada de un grupo que consiste de hirudina que ocurre naturalmente, variaciones de hirudina sintética, derivados de hirudina, variaciones de hirudina recombinante, miméticos, y una de sus combinaciones que reconoce al lugar de enlaces de sustratos de la trombina, donde el anticuerpo específico de trombina es elevado en contra de una trombina que tiene a un lugar activo bloqueado por una molécula seleccionada de un grupo que consiste de Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK - Phe-Pro-Arg-chloromethylketone), ácido 4-aminofenilpirúvico (APPA - aminophenylpyruvic acid), fluoruro de bencenosulfonilo de 4-(2-aminoetilo) (AEBSF - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride), y una de sus combinaciones.

## 25 RESUMEN DE LA PRESENTACIÓN

El invento se refiere a un inmuensayo in-vitro para cuantificar la trombina en una muestra en la presencia de anti-trombina III (AT-III), tal como se define en las reivindicaciones.

30 En un aspecto, el inmuensayo comprende los pasos de: contactar a la muestra con una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlaces de sustratos de la trombina; contactar a la trombina con un anticuerpo específico de trombina elevado en contra de una trombina bloqueada en el lugar activo; y medir el nivel de anticuerpos enlazados, tal como se definió en las reivindicaciones.

35 En otro aspecto, el inmuensayo comprende los pasos de: contactar a la muestra con una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlaces de sustratos de la trombina; agregar a la muestra a un anticuerpo específico de trombina, donde el anticuerpo específico de trombina es elevado en contra de una trombina que tiene a un lugar activo bloqueado, medir el enlace del anticuerpo a la trombina; y determinar el monto de trombina presente, tal como se define en las reivindicaciones.

40 En una implementación del invento, la muestra es un espécimen biológico seleccionado de un grupo que consiste de sangre o de componentes sanguíneos.

45 La molécula pequeña seleccionada de un grupo que consiste de hirudina que ocurre naturalmente, variaciones de hirudina sintética, derivados de hirudina, variaciones de hirudina recombinante, miméticos y una de sus combinaciones.

50 El anticuerpo específico de trombina es un anticuerpo policlonal o uno de sus fragmentos. El anticuerpo es elevado en contra de una trombina que tiene a un lugar activo bloqueado con un péptido seleccionado de un grupo que consiste de Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK - Phe-Pro-Arg-chloromethylketone), ácido 4-aminofenilpirúvico (APPA - aminophenylpyruvic acid), fluoruro de bencenosulfonilo de 4-(2-aminoetilo) (AEBSF - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride), y una de sus combinaciones.

55 En otra implementación adicional del invento, el inmuensayo es un inmuensayo de fase sólida tal como un inmuensayo tipo emparejado.

En otra implementación adicional del invento, la determinación del monto de trombina se ejecuta con una curva estándar de trombina.

60 El invento también suministra un botiquín para cuantificar trombina en una muestra que comprende de anti-trombina III (AT-III), donde el botiquín comprende a un anticuerpo policlonal específico de trombina o a uno de sus fragmentos y a una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlace de sustratos de la trombina, donde el anticuerpo específico de trombina es elevado en contra de una trombina que tiene a un lugar activo bloqueado, tal como se definió en las reivindicaciones.

65

## DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS

La figura uno muestra el rendimiento (valores OD) de un inmunoensayo desarrollado para la determinación de niveles de trombina en una muestra de amortiguación.

5 La figura 2 muestra los valores OD obtenidos por el inmunoensayo específico de trombina en muestras que tienen a concentraciones crecientes de trombina en un amortiguador (◆) en comparación con los valores OD obtenidos en muestras de plasma mezcladas con concentraciones crecientes de trombina (▲).

10 La figura 3 muestra a los valores OD obtenidos por el inmunoensayo específico de trombina en muestras que tienen concentraciones crecientes de trombina en un amortiguador y que contienen a AT-III (▲) y en muestras que tienen concentraciones crecientes de trombina en un amortiguador en la ausencia de AT-III (◆).

15 La figura 4-6 muestra el efecto de agregar a una mezcla de hirudina y de plasma (figura 4), de hirudina y AT-III (figura 5) o hirudina, AT-III y heparina (figura 6) a muestras de trombina para la detección de trombina mediante el inmunoensayo.

La figura 7 muestra el incremento de los niveles de detección de trombina en muestras de plasma utilizando al inmunoensayo específico de trombina al agregar hirudina a las muestras.

## 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se descubrió, de acuerdo a este invento, que la detección de la trombina mediante un inmunoensayo específico de trombina está comprometido por sustancias que interfieren que están presentes en el plasma. También se descubrió que la interferencia detectada en el plasma podría, por lo menos en parte, deberse a la presencia de AT-III.

25 Además, se descubrió, sorprendentemente, de acuerdo a este invento, que la adición de trombina a una muestra que contiene hirudina junto con AT-III resultó en un incremento en la capacidad del inmunoensayo específico de trombina para detectar trombina en la muestra en comparación con la muestra de control que no tiene hirudina. Estos resultados indicaron que la hirudina mejora la detección de la trombina en la presencia de anti-trombina III.

30 Estos hallazgos son sorprendentes, en vista de que el lugar de enlaces de la hirudina y de la AT-III en la molécula de trombina son diferentes y que la hirudina, a diferencia de la AT-III, es una molécula pequeña. El lugar de enlaces de la hirudina en la trombina se superpone con el lugar de enlaces del fibrinógeno de la trombina (Chang JY. The hirudin-binding site of human alpha-thrombin. Identification of lysyl residues which participate in the combining site of hirudin- thrombin complex (el lugar de enlaces de la hirudina de la alfa-trombina humana. Identificación de residuos de lisilo que participan en el lugar de combinación del complejo hirudina-trombina). J Biol Chem. 5 de mayo de 1989; 264(13):7141-6; Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin (Mecanismos de reconocimiento molecular de la trombina). J Thromb Haemost. Agosto de 2005; 3(8):1861-72) donde el lugar de enlaces de la AAT-III se superpone con el lugar catalítico de la trombina (Griffith MJ. Kinetics of the heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction. Evidence for a template model for the mechanism of action of heparin (Cinética de la reacción antitrombina III/trombina mejorada por la heparina. Evidencia para un modelo plantilla para el mecanismo de acción de la heparina). J Biol Chem. 10 de julio de 1982; 257(13):7360-5; y Markwardt et al. The influence of synthetic thrombin inhibitors on the thrombin-antithrombin reaction. Thrombosis research (La influencia de los inhibidores sintéticos de trombina en la reacción de trombina-antitrombina). 1973 Vol.2, 343-348).

45 También se descubrió que la adición de hirudina después de mezclar a la trombina con la AT-III resultó en un incremento en la detección de trombina en comparación con el control en la ausencia de hirudina. La hirudina reduce la interferencia encontrada en un inmunoensayo específico de trombina cuando se examinan a muestras de plasma u otras muestras que contienen a AT-III.

50 Sin atarse a ningún mecanismo, parece que grupos antigénicos en la trombina están escondidos y/o alterados por la asociación de trombina con la AT-III, y que la adición de hirudina reduce la interferencia que la AT-III ejerce para el inmunoensayo, y, por lo tanto, incrementa la detección de la trombina por el inmunoensayo.

55 Estos hallazgos crean el camino para el desarrollo de un método de un inmunoensayo que permita determinar los niveles de trombina bajo condiciones con altos niveles de AT-III, es decir, la condición prevalente encontrada en las muestras de plasma.

60 El invento suministra un inmunoensayo in vitro para cuantificar la trombina en una muestra en la presencia de AT-III, tal como se definió en las reivindicaciones. El método comprende los pasos de: contactar a la muestra con una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlaces de sustratos de la trombina tal como el lugar de enlaces de fibrinógeno; agregar a la muestra a un anticuerpo específico de trombina; medir el enlace del anticuerpo a la trombina; y determinar el monto presente de trombina.

65 El término "contactar" se refiere a una acción combinatoria que hace que la molécula pequeña contacte a la muestra y más particularmente a una acción combinatoria que hace que la molécula pequeña entre en contacto con la

trombina en una forma tal que una interacción enlazadora ocurrirá entre la molécula pequeña y la trombina presente en la muestra.

El término “molécula pequeña” se refiere a, por ejemplo, una molécula con una masa molecular en el rango de 400 a 100,000 Dalton, tal como en el rango de 400 a 50,000 Dalton o 400 a 40,000 Dalton o 400 a 8000 Dalton o 400 a 1000 Dalton o 5000 a 40,000 Dalton o 1000 a 8000 Dalton. La molécula pequeña puede ser un mimético sintético de hirudina que tiene una estructura tridimensional similar pero que no tiene ninguna secuencia duplicadora. Un mimético de hirudina puede identificarse al examinar, por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos, por ejemplo, de péptidos aleatorios. La examinación debe basarse en la competencia de los péptidos para el enlace de hirudina para el lugar de enlaces de sustratos en la trombina. En una implementación del invento, se utiliza un ensayo tipo emparedado ELISA. Un anticuerpo monoclonal específico para el lugar catalítico de la trombina puede ser utilizado para cubrir a la placa de micro titulación de ELISA. La placa es cargada con trombina en una solución de bloqueo y el exceso de trombina es removido mediante varios lavados. Después de eso, la hirudina en la solución de bloqueo es cargada, y el exceso de hirudina es lavado y sacado. Entonces, la hirudina que se enlaza a la placa (enlace de un 100% de hirudina) es detectada utilizando anticuerpos anti-hirudina poligonales marcados. El enlace de la hirudina también puede detectarse al usar a una hirudina marcada, por ejemplo, 3H-hirudina. En pozos de prueba, péptidos individuales son incluidos en ELISA, y la reducción de la hirudina que se enlaza a las placas debido a la presencia de un péptido específico es una indicación que el péptido es posiblemente un péptido imitador.

En una implementación, la molécula pequeña que reconoce al lugar de enlaces de sustratos de la trombina inhibe a por lo menos el 50% de los enlaces de trombina con el fibrinógeno. Las moléculas pequeñas utilizadas en el método de la presentación pueden ser un péptido, un compuesto químico sintético, hirudina que ocurre naturalmente, variaciones de hirudina sintética, derivados de hirudina y/o variaciones de hirudina recombinante que mantiene la capacidad de enlazarse al lugar de enlaces de sustratos de la trombina.

Variaciones comprenden a aquellos polipéptidos de hirudina que contienen sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos en relación a la hirudina que ocurre naturalmente. Comúnmente, las sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos no alteran la capacidad de la variación de enlazarse al lugar de enlaces de sustratos de la trombina. La variación también puede comprender a residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente.

Derivados comprenden a alteraciones glicosiladas, alteraciones aciladas y/u otras alteraciones químicas; sustituyentes que no sean de aminoácidos tales como, por ejemplo, una molécula reportadora y/u otro ligando que sea enlazado covalentemente o no covalentemente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Un mimético comprende a un número muy grande de moléculas pequeñas que tiene la capacidad de reproducir la conformación tridimensional de la hirudina sin duplicar necesariamente su estructura. Este mimetismo no necesita ser una duplicación completa, y también podría ser una aproximación la cual es suficientemente similar a aquella de la hirudina para que el mimético sea capaz de enlazarse con la trombina.

En una implementación del invento, la molécula pequeña es agregada a la muestra examinada en un monto que neutraliza a la trombina que se encuentra presente en la muestra. La tasa molar entre la hirudina y la trombina en la muestra es igual a 0.64 o más alta, por ejemplo, una tasa molar de 0.67, 1.27, 2.55, 5.10, 10.20, 12.76, 20.41, 25.52, 40.82, 51.05, 81.63, 102.56, 205.13, 410.26, 816.36, y 1632.65 o más alta.

En una implementación, se sospecha que la trombina está presente en la muestra a alrededor de 1 unidad y la hirudina es agregada a alrededor de 0.64 unidades de antitrombina o más.

A menudo, los términos “neutraliza” e “inhibe” son intercambiables.

El término “molécula que reconoce al lugar de enlace de sustratos de la trombina” se refiere a una molécula que tiene una afinidad con el lugar de enlace de sustratos de la trombina. En una implementación del invento, el lugar de enlace de sustratos de la trombina reside en el exosito I. En otra implementación del invento, un elemento clave de enlace es el Tyr76, ubicado a 20 Å de distancia del lugar activo de la trombina tal como en el caso del fibrinógeno (Thierry Rose y Enrico Di Cera. Three-dimensional Modeling of Thrombin-Fibrinogen Interaction (Modelaje Tridimensional de la Interacción Trombina-Fibrinógeno). JBC 2001 Vol 277 N21, 18875-1880).

El inmunoensayo del invento puede ejecutarse en cualquier muestra, por ejemplo, en un espécimen biológico tal como sangre; componentes sanguíneos tales como el plasma y otras fracciones derivadas de la sangre; otros fluidos corporales que tienen trombina y anti-trombina III; y similares.

El anticuerpo específico de trombina utilizado de acuerdo a este invento es elevado en contra de una trombina que tiene a un sitio activo bloqueado. El término “una trombina que tiene a un sitio activo bloqueado” se refiere a una trombina que tiene a un péptido enlazado a su sitio activo. En una implementación del invento, el sitio activo de la trombina reside en una hendidura que va desde P4 a P2’ mostrado en la figura 2 de Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin (Mecanismos de reconocimiento molecular de la trombina). J Thromb Haemost. Agosto de 2005; 3(8):1861-72). El péptido (aquí denominado el “péptido bloqueador”) puede ser, por ejemplo, un

derivado de péptidos de PRI-aminoácidos en el rango de alrededor de 400 a 1000 Dalton, Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK - Phe-Pro-Arg-chloromethylketone), ácido 4-aminofenilpirúvico (APPA - aminophenylpyruvic acid) o fluoruro de bencenosulfonilo de 4-(2-aminoetilo) (AEBSF - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride). El término "lugar activo" es intercambiable con el término "lugar catalítico".

El anticuerpo específico de trombina puede ser un anticuerpo monoclonal, una cadena individual, fragmentos de Fab, incluyendo a los productos de una biblioteca de expresiones de inmunoglobulina de Fab, un anticuerpo polidonal o sus fragmentos, siempre y cuando éstos muestren la especificidad de enlace en relación a la trombina y/o sean capaces de enlazar a la trombina.

El término "anticuerpo policlonal" se refiere a una población heterogénea de anticuerpos. Esto podría comprender a anticuerpos que tienen funciones de enlace de antígenos específicas para epítopes diferentes dentro de la trombina. Los anticuerpos polidionales podrían ser generados al inmunizar a un animal, por ejemplo, de especies de mamíferos, tal como el conejo, la cabra, el burro y la oveja, con trombina humana. La trombina utilizada para la inmunización puede ser preparada a partir de protrombina humana purificada. Las rutas de inmunización incluyen, pero no se limitan a, intradérmicas, intraperitoneales, subcutáneas, intramusculares, intracraneales y/o intravenosas. El término "anticuerpo monodonal" se refiere a una preparación de anticuerpos producida a partir de un solo clon de células que producen anticuerpos, por ejemplo, a un clon individual de células de hibridomas. Comúnmente, los anticuerpos monodonales son producidos mediante tecnología de hibridomas. El término "hibridomas" se refiere a células que han sido diseñadas para producir a un anticuerpo deseado en grandes montos, por ejemplo, para producir anticuerpos monoclonales. Para producir anticuerpos monoclonales, las células B pueden ser removidas del vaso de un animal (por ejemplo, cualquier especie de mamíferos) que haya sido inmunizado con trombina. La trombina utilizada para la inmunización puede ser preparada a partir de protrombina humana purificada. Las rutas de inmunización incluyen, pero no se limitan a, intradérmicas, intraperitoneales, subcutáneas, intramusculares, intracraneales y/o intravenosas. Las células B pueden ser fusionadas entonces con células tumorales de mieloma que pueden crecer indefinidamente en cultivos. Esta fusión puede ser realizada al hacer que las membranas celulares sean más permeables. Las células fusionadas, siendo estas células cancerígenas, puede multiplicarse rápidamente e indefinidamente y pueden producir montos grandes de los anticuerpos deseados. Los anticuerpos producidos pueden ser examinados para detectar su especificidad y afinidad con la trombina. Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales son conocidos en la industria, tal como lo son los métodos para determinar su especificidad (refiérase, por ejemplo, a Shivanand Pandey. "HYBRIDOMA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES" ("TECNOLOGÍA DE HIBRIDOMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES") International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research (Revista Internacional de Revisiones e Investigaciones de Ciencias Farmacéuticas). 2010; volumen 1, ejemplar 2:88-94).

La producción y purificación de anticuerpos policlonales y monodonales son bien conocidas en la industria (Immunoassay (Inmunoensayo), Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulo 5). El anticuerpo específico de trombina puede ser recombinante (Immunoassay (Inmunoensayos), Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulo 6).

La marcación de anticuerpos para cuestiones de detección es un método bien conocido en la industria (Immunoassay (Inmunoensayos), Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulo 8).

El término "detectar anticuerpos" y "anticuerpos marcados/anticuerpo marcado" se refiere a anticuerpos que son capaces de ser descubiertos. El anticuerpo detector podría ser conjugado directamente o indirectamente (por ejemplo, a través de otro anticuerpo) con una señal detectable o con una partícula generadora de señales. La señal puede ser radiactiva (por ejemplo, yodo, tritio, carbono, sulfuro radiactivos o similares), clorométrica, fluorescente y similares. Las moléculas generadoras de señales que pueden actuar en sustratos generadores de señales incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano (HRP - horseradish peroxidase) [sustratos adecuados incluyen a 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) OPD; sal de diamonio del ácido 2,2'-azino bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico]; fosfatasa alcalina [sustratos adecuados incluyen a la sal de sodio de fosfato de p-nitrofenilo]; y 13-galactosidasa [sustratos adecuados incluyen a O-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido]. La señal podría ser amplificada utilizando un sistema de conjugación de avidina-biotina.

Tipos diferentes de inmunoensayos que se basan en la interacción de enlace entre determinantes antigénicos de un antígeno y la porción de enlace de antígenos del anticuerpo específico son bien conocidos en la industria (Immunoassay (Inmunoensayo), Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulos 8-19), por ejemplo, inmunoensayos de fase sólida, por ejemplo, Ensayo Inmunoabsorbente Enlazado a Enzimas (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), por ejemplo, un inmunoensayo de los lugares (tipo emparedado, donde un antígeno es colocado entre un anticuerpo inmovilizado y un anticuerpo marcado), el sistema de inmunoensayo de avidina-biotina, western blots, inmunoprecipitaciones, radioinmunoensayos (RIA - Radioimmunoassay), inmunoensayos de enzimas, inmunoensayos de fluorescencia (donde los marcadores fluorescentes son conjugados con el anticuerpo, por ejemplo, fluoresceína, rodamina y similares), inmunoprecipitaciones, ensayos de quimioluminiscencia (donde se utilizan las moléculas orgánicas que omiten luz en la modificación de la estructura química, por ejemplo, isoluminol, pirogalol, luciferina, luminol o similares), ensayos de bioluminiscencia, técnicas de inmunomarcación y similares. El término "determinantes antigénicos" se

refiere a la región en el antígeno que es reconocida por el anticuerpo.

5 Para anticuerpos enlazadores (de recubrimiento) para pozos de micro titulación de poliestireno, los anticuerpos específicos de antígenos pueden ser diluidos en un amortiguador de carbonato con un pH 9-9.6 tal como se especifica en los ejemplos más adelante. Enlaces covalentes han sido reportados (Immunoassay (Inmunoensayo), Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulo 24). El paso de recubrimiento es ejecutado usualmente mediante la incubación de los anticuerpos específicos de antígenos en los pozos bajo la presencia de una solución bloqueadora, por ejemplo, BSA. Un 2º anticuerpo puede ser utilizado para detectar al antígeno que está enlazado con el anticuerpo de recubrimiento. El 2º anticuerpo puede ser marcado. 10 Después, los estándares de antígenos apropiados (por ejemplo, la trombina) pueden ser preparados para la curva de calibración (Immunoassay (Inmunoensayo), Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulo 24). Los términos "anticuerpo de recubrimiento", "anticuerpo de captura" y "anticuerpo inmovilizado" se refieren, usualmente, a un anticuerpo que está presente en la superficie de un soporte sólido. El anticuerpo de recubrimiento puede ser orientado para que su porción enlazadora de antígenos esté disponible para contactar al antígeno presente en la muestra. En caso de que la detección sea indirecta (por ejemplo, sea ejecutada a través de un 2º anticuerpo), el 2º anticuerpo detector puede ser generado en una especie diferente que la especie utilizada para generar al anticuerpo de captura. El término "determinar el monto de trombina" se refiere a una determinación cualitativa o cuantitativa.

20 ELISA puede ser cualitativa o cuantitativa. Los resultados cualitativos suministran un simple resultado positivo o negativo en relación a la presencia de trombina dentro de la muestra examinada. Usualmente se utiliza a 2 o 3 veces la desviación estándar (el error inherente en una prueba) para distinguir a muestras positivas de las negativas. En un ensayo ELISA cuantitativo, la densidad óptica (OD – optical density) de la muestra es comparada con una curva estándar, que comúnmente es una dilución en serie de montos conocidos de trombina purificada. En una sección del invento, las diferentes concentraciones conocidas de trombina son preparadas de la siguiente forma: se diluye a una solución estándar de trombina con una concentración de 43.9 microgramos/mililitros a una concentración de 6.27 microgramos/mililitros (6270 ng/mililitro) en un amortiguador de bloqueo (1% de bloqueador I en 0.05% de Tween-20 en PBS). Luego, se diluye en serie 2 veces a la solución diluida estándar de trombina (7 veces) al transferir a 100 microlitros provenientes de la dilución anterior a un tubo que contiene a 100 microlitros de amortiguador de bloqueo. 30 Se preparan a 8 diluciones desde 6270 hasta 49 ng/mililitro. Luego se diluye además a cada una de las diluciones de trombina, ya mencionadas, (1:10) en un amortiguador de bloqueo obteniendo concentraciones finales de trombina de 4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156.7, 313.5, y 627 ng/mililitro. En el siguiente paso, se transfieren a 100 microlitros de cada una de las soluciones finales de trombina a una placa micro-ELISA pre-cubierta y se ejecuta al inmunoensayo tal como se indica más adelante sin la adición de la molécula pequeña. Los inmunoensayos pueden ser automatizados (Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, capítulo 21).

40 En una implementación del invento, se ejecuta un inmunoensayo de fase sólida. Se puede utilizar a diferentes fases sólidas, tales como tubos, micropartículas, materiales de partículas magnéticas, micropartículas de plástico, soportes de plástico, columnas, láminas pequeñas y placas de ensayos, es decir, pozos de micro - titulación.

En una sección del invento, se utiliza al siguiente inmunoensayo desarrollado de 2 sitios (tipo emparedado) para detectar trombina en una muestra examinada: en el primer paso, se agrega a una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlaces de sustratos de la trombina a la muestra examinada. La molécula pequeña es hirudina agregada a una concentración final que neutraliza a por lo menos 1 unidad NIH de trombina, por ejemplo, en un monto que neutraliza a 20 U NIH de trombina. La muestra, que contiene a la trombina, puede incubarse junto con la molécula pequeña durante alrededor de 15 minutos. Entonces, se coloca a la muestra que comprende a las moléculas pequeñas utilizando pipetas en una fase sólida donde se incuba, y la cual fue pre-cubierta con un exceso de anticuerpos policlonales específicos de trombina ("anticuerpo de captura"). Durante esta incubación, la trombina en la muestra se enlaza con el anticuerpo de captura y se lavan y se extraen entonces a todos los otros constituyentes de la muestra. Luego, se agrega un exceso de anticuerpos marcados policlonales específicos de trombina. Después de la incubación, se lava y se extrae al exceso de anticuerpos marcados y se mide a la señal de los anticuerpos marcados enlazados (por ejemplo, al medir la densidad óptica [OD – optical density]). Se puede llevar a cabo a la cuantificación/determinación de los niveles de trombina por medio de comparaciones y extrapolaciones a partir de una curva estándar de trombina creada utilizando a montos de trombina purificada, tal como ya fue especificado en este documento. En esta implementación del inmunoensayo, el mismo anticuerpo polidonal específico de la trombina sirve como el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado.

60 En una implementación alterna de la presentación, se utiliza a un anticuerpo monoclonal como el anticuerpo de captura y como el anticuerpo marcado. En una implementación como esa, el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado son diferentes y deben reconocer a epítopes separados en la trombina así que ninguno obstaculiza el enlace del otro. En una implementación de la presentación, no se dirigen a los anticuerpos monoclonales específicos de trombina al lugar de enlace de sustratos.

65 En un ejemplo de ELISA, se pre-cubre en exceso a un anticuerpo de captura específico de la trombina, por ejemplo, un anticuerpo polidonal en un pozo de micro titulación. Más específicamente, se diluye a la solución de anticuerpos

(por ejemplo, de una concentración proteínica de 2 mg/mililitro) en un rango de 1:200 a 1:100 tal como 1:500 en un amortiguador de recubrimiento (50 mM de amortiguador de carbonato; pH = 9.6) y se agregan 100 microlitros de anticuerpos diluidos a cada pozo. Se incuba a la placa de micro - titulación durante la noche a 2-8 °C. Entonces, se descarta a la solución de recubrimiento y se lava tres veces a la placa de micro - titulación con 200 µl/pozo de amortiguador de lavado (0.05% de Tween-20 en PBS). Subsiguientemente, se agregan a 200 µl de amortiguador de bloqueo (1% de Bloqueador de I en un amortiguador de lavado) a cada pozo y se incuba la placa de micro titulación a 37 °C durante una hora. Al final de la incubación, se extrae al amortiguador de bloqueo. Cada muestra examinada, por ejemplo, un fluido biológico, se contacta con una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlace de sustratos de la trombina. La muestra puede ser incubada junto con la molécula pequeña durante alrededor de 15 minutos. Las muestras probadas pueden diluirse a 1:5 en un amortiguador de bloqueo, y se agrega entonces a 100 microlitros de cada muestra diluida a los pozos pre-cubiertos. Se incuba entonces la placa durante una hora a 37 °C. Después del periodo de incubación, se descartan las soluciones de muestra, y se lava a los pozos con un amortiguador de lavado. Luego, se agrega una solución de 100 µl que comprende a HRP de anticuerpos policlonales que detectan a trombina conjugados y diluidos en un rango de 1:200 a 1:100, tal como 1:500, en un amortiguador de bloqueo (por ejemplo, de una solución almacenada que tiene una concentración proteínica de 2 mg/mililitro) en cada pozo. Se incuba a la placa durante una hora a 37 °C, se lava en un amortiguador de lavado, tal como fue mencionado anteriormente, y se agregan 100 µl de un sistema de sustratos líquidos de 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) para ELISA (sustrato HRP) a cada pozo. Se incuba a la placa a la temperatura del cuarto durante alrededor de 60 minutos (hasta que se observa un color azul fuerte en los pozos que contienen a una concentración alta de trombina). Se detiene la reacción al agregar 100 µl de solución de parada (1 M de ácido hidrodórico) a cada pozo. La placa es leída con un OD<sub>450 nm</sub> y se puede extrapolar la concentración precisa de trombina en la muestra por medio de comparaciones con una curva estándar de trombina preparada a partir de concentraciones conocidas de trombina, tal como se describió anteriormente. Comúnmente, se utiliza al rango lineal de la curva estándar de trombina para calcular la concentración precisa de trombina en la muestra examinada.

En una implementación del invento, el anticuerpo de captura es un anticuerpo de oveja de trombina anti-humana policlonal (por ejemplo, un anticuerpo que es fabricado por Affinity Biologicals; número de catálogo SAHT-AP). En otra implementación del invento, el inmunógeno utilizado para generar al anticuerpo policlonal es trombina preparada a partir de protombina humana purificada, con el lugar activo bloqueado con PPACK. En una implementación adicional del invento, el anticuerpo de detección es el HRP de anticuerpos de trombina anti-humana de oveja conjugadas (por ejemplo, un anticuerpo tal como lo fabrica Affinity Biologicals; número de catálogo SAHT-HRP).

En otra implementación del invento, se utiliza a un ensayo ELISA indirecto. En un ensayo ELISA indirecto de ejemplo, la muestra examinada se pone en contacto con una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlace de sustratos de la trombina, tal como, el lugar de enlace del fibrinógeno, y luego se agrega a una fase sólida, por ejemplo, un pozo de una placa de micro - titulación, donde se espera para que se adhiera al plástico, por ejemplo, por medio de una interacción de cargas. Luego, se agrega una solución de proteínas que no reaccionan, tal como alúmina sérica bovina o caseína, para bloquear a cualquier superficie plástica en el pozo que siga sin estar cubierta por el antígeno que está presente dentro de la muestra examinada. En el siguiente paso, se agrega a cada pozo al anticuerpo primario que se enlaza específicamente a la trombina. Después de eso, se agrega a cada pozo a un anticuerpo secundario que se enlaza al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario tiene una enzima adherida a este, la cual tiene un efecto insignificante para las propiedades de enlace del anticuerpo. Entonces, se agrega a un sustrato para esta enzima. Este sustrato cambia de color cuando reacciona con la enzima. El cambio de color muestra que el anticuerpo secundario se ha enlazado al anticuerpo primario. Comúnmente, se lava a la placa después de la adición de los anticuerpos primario y secundario, de tal forma que se pueden remover a los anticuerpos que no se enlazaron. En una sección alterna, se utiliza al anticuerpo enlazado a una enzima para detectar la presencia de trombina dentro de la muestra. Se utiliza un espectrómetro para dar valores cuantitativos a la fuerza del color. La señal detectable puede ser radiactiva (por ejemplo, yoduro, tritio, carbono, azufre radiactivos o similares), clorométrica, fluorescente y similares.

El invento suministra un botiquín para cuantificar a la trombina en una muestra que contiene a anti-trombina III (AT-III), tal como fue definido en las reivindicaciones, el botiquín contiene a los siguientes componentes: un anticuerpo policlonal específico de trombina y una molécula pequeña que reconoce al lugar de enlace de sustratos de la trombina, donde se genera al anticuerpo específico de la trombina en contra de una trombina que tenga a un sitio activo bloqueado. El botiquín puede incluir instrucciones para su uso y/o trombina purificada para preparar a la curva estándar. Se puede facilitar a los componentes del botiquín como polvos, soluciones y/o sus combinaciones. Se puede facilitar a las soluciones en una forma congelada.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no son limitantes.

## EJEMPLOS

### MATERIALES Y MÉTODOS.

*Procedimiento del inmunoensayo:*



1. *Recubrimiento de una placa micro-ELISA con un anticuerpo de captura.*

Se recubrió a una placa de micro-Elisa (96 pozos; Costar; número de catálogo 9018) con anticuerpos de oveja de trombina anti-humana polidonal (Affinity Biologicals; número de catálogo SAHT-AP; se preparó al inmunógeno utilizado para generar al anticuerpo policlonal con trombina a partir de protrombina humana purificada, bloqueando al lugar activo con PPACK). Se ejecutó al procedimiento de recubrimiento de la siguiente forma: se diluyeron a los anticuerpos a 1:500 en un amortiguador de recubrimiento (50 mM de amortiguador de carbonato; pH = 9.6; Sigma; número de catálogo C-3041) y se agregaron 100 µl de los anticuerpos diluidos a cada pozo. Se incubó entonces a la placa micro-ELISA durante la noche (durante alrededor de 16 horas) a 2-8 °C. Entonces, se desechó a la solución de recubrimiento y se lavó 3 veces a los pozos con 200 µl/pozo de amortiguador de lavado [0.05% de Tween-20 (Sigma; número de catálogo P-1379) en PBS (Biological Industries; número de catálogo 02-023-SA)]. Subsiguientemente, se agregaron a 200 µl de amortiguador de bloqueo [1% de bloqueador de I (Tropix; número de catálogo AI300) en un amortiguador de lavado] a cada pozo y la placa ELISA fue incubada a 37 °C durante una hora. Se removió entonces al amortiguador de bloqueo antes de la adición de la muestra examinada.

2. *Adición de las muestras examinadas y del anticuerpo enlazado marcado a los pozos pre-cubiertos y la medición de la señal del anticuerpo enlazado marcado.*

Se diluyeron a las muestras examinadas a 1:5 en un amortiguador de bloqueo, y se agregaron a 100 µl de cada muestra diluida en la placa micro-ELISA pre-cubierta. Entonces se incubó a la placa durante una hora a 37 °C. Después del período de incubación, se desechó a las soluciones de muestra, se lavaron 3 veces a los pozos con 200 µl/pozo de amortiguador de lavado, tal como se especificó anteriormente, y se agregaron 100 µl de HRP de anticuerpos anti-trombina conjugados (Affinity Biologicals; número de catálogo SAHT-HRP; diluido a 1:500 en un amortiguador de bloqueo; "anticuerpo marcado") a cada pozo. Se usó a plasma de cerdo no tratado como control negativo. Se utilizaron a concentraciones conocidas de trombina (4.9 a 627 ng/mililitros) en un amortiguador de bloqueo como control positivo. No se presentaron a los resultados OD de los grupos de control negativo y positivo en los resultados que se muestran más adelante. Se incubó a la placa durante una hora a 37 °C, se lavó 3 veces con 200 µl/pozo de amortiguador de lavado, tal como se especificó anteriormente, y 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB – un sustrato HRP; Sigma, número de catálogo T-0440) en cada pozo. Se incubó la placa a la temperatura del cuarto (alrededor de 22 ± 3 °C) durante alrededor de 60 minutos (hasta que se observó un color azul fuerte en los pozos que contenían a la concentración más alta de trombina). Se detuvo la reacción al agregar 100 µl de solución de parada (1M de ácido hidroclicórico; Riedel de Haen; número de catálogo 30721) a cada pozo. La placa fue leída a OD<sub>450 nm</sub>. Un incremento en el valor OD obtenido indica una concentración más alta de trombina en la muestra. Se extrapola a la concentración precisa de trombina en la muestra al compararse con una curva estándar de trombina creada utilizando montos conocidos de la trombina purificada. Se utiliza al rango lineal de la curva estándar de trombina para calcular a la concentración precisa de trombina en la muestra.

*Preparación de concentraciones diferentes de trombina utilizadas en los ejemplos a continuación:*

Se utilizó a un estándar de Omrix para la preparación de diferentes concentraciones de trombina (43.9 microgramos/mililitros). Para obtener a las diferentes concentraciones, se diluyó al estándar de trombina a una concentración de 6.27 microgramos/mililitros (6270 ng/mililitro) en un amortiguador de bloqueo (refiérase a los componentes ya mencionados). Luego, se diluyó en serie 2 veces (7 veces) a la solución estándar de trombina diluida al transferir a 100 µl desde la dilución anterior a un tubo que contenía a 100 µl de amortiguador de bloqueo. Se prepararon a 8 diluciones desde 6270 hasta 49 ng/mililitro. Luego, se diluyó a cada una de las diluciones ya mencionadas (1:10) en la muestra examinada.

**Ejemplo 1 - Emparedado ELISA para detectar a la trombina en una muestra**

Se desarrolló a un inmunoensayo de 2 lugares (tipo emparedado) para detectar la trombina en una muestra examinada. Brevemente, la muestra que contenía a la trombina fue puesta una fase sólida con pipetas, la cual fue pre-cubierta con un exceso de anticuerpos anti-trombina policlonales ("anticuerpo de captura"), y se incubó tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Durante esta incubación, la trombina en la muestra se enlaza al anticuerpo de captura y se lavan a todos los otros constituyentes de la muestra. Luego, se agrega un exceso de anticuerpos anti-trombina marcados. Después de la incubación, se lava y se separa al exceso de anticuerpos marcados. En este inmunoensayo, el mismo anticuerpo policlonal sirvió como el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección/marcación. El anticuerpo policlonal fue una trombina anti - humana de oveja IgG de afinidad purificada. Los anticuerpos fueron generados al utilizar como inmunógeno a trombina humana purificada (preparada a partir de protrombina purificada) con el lugar activo/lugar catalítico bloqueado con PPACK. El PPACK es un péptido que se enlaza al lugar catalítico de la trombina.

En este experimento se examinó la capacidad del inmunoensayo desarrollado anteriormente para detectar los niveles de trombina en una muestra. Con este fin, se prepararon muestras que contenían concentraciones crecientes de trombina en un amortiguador de bloqueo (concentraciones finales de trombina en la muestra de alrededor de: 4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156.7, 313.5, y 627 ng/mililitro preparadas tal como se mencionó anteriormente)

y se ejecutó al inmunoensayo tal como se mencionó específicamente en la sección anterior de Materiales y Métodos. Se detectó a la señal de los anticuerpos enlazados marcados en cada muestra y se presentan a los resultados en la figura 1.

5 Se descubrió que la señal de los anticuerpos enlazados es directamente proporcional a la concentración de trombina en una muestra que contiene a concentraciones precisas de trombina en el amortiguador. Las 5 diluciones más bajas estuvieron dentro de un rango lineal.

10 Se concluyó, por lo tanto, que este inmunoensayo es una herramienta que puede utilizarse para determinar el nivel de trombina en una muestra examinada de un amortiguador que contenga trombina (al compararse a una curva estándar de trombina creada utilizando a montos conocidos de trombina purificada).

**Ejemplo 2 - Interferencia de sustancias presentes en el plasma con la detección de trombina mediante el inmunoensayo específico de trombina.**

15 El experimento anterior muestra la capacidad del inmunoensayo ya mencionado para detectar a la trombina en una muestra de un amortiguador que contenga trombina. En este experimento, se examinó la capacidad del inmunoensayo desarrollado anteriormente para detectar a la trombina en muestras de plasma de cerdos (obtenidas del Instituto de investigación animal, Kibutz Lahav Israel) a las cuales se les agregó concentraciones crecientes de trombina (igual que en el ejemplo 1). Se usaron como referencia a concentraciones comparables de trombina en un amortiguador de bloqueo. El inmunoensayo se ejecutó tal como se mencionó anteriormente, y los valores OD obtenidos para ambos grupos [es decir, el grupo 1 - las muestras de plasma cargadas con trombina ( ▲ ); y el grupo 2 - una muestra del amortiguador que contiene a trombina ( ◆ )] tal como se mostró en la figura 2.

25 Puede observarse que los resultados OD obtenidos a partir de la trombina en el plasma fueron mucho más bajos que los resultados OD obtenidos de la trombina en el amortiguador de bloqueo con la misma concentración de trombina. Se descubrió, por lo tanto, que el inmunoensayo se compone de sustancias que causan interferencia que se encuentran en el plasma.

**Ejemplo 3 - Interferencia de AT-III con la detección de trombina mediante el inmunoensayo específico de trombina.**

35 El ejemplo 2 muestra que existen sustancias en el plasma que causan interferencia con el inmunoensayo específico de trombina. La concentración normal de AT-III en el plasma sanguíneo humano es alta y es de aproximadamente 0.12 miligramos/mililitro. Se ejecutó al siguiente experimento para examinar si la AT-III existente en el plasma es el factor que interfiere con el inmunoensayo.

40 Con este fin, se prepararon a muestras con AT-III (American diagnostica; número de catálogo 433; diluido en amortiguador de bloqueo a una concentración final de 1 IU/mililitro) o sin AT-III (solución de amortiguador de bloqueo tal como se mencionó anteriormente). Después, se agregaron diferentes concentraciones de trombina a estas muestras (concentraciones finales de 4.9, 9.8, y 19.5 ng/mililitro preparadas tal como se mencionó anteriormente). Se ejecutó al inmunoensayo tal como se indicó anteriormente para detectar la trombina en las muestras.

45 Puede observarse que los resultados OD obtenidos en la presencia de AT-III fueron mucho más bajos que los resultados OD obtenidos en la ausencia de AT-III (figura 3).

50 Se descubrió que la AT-III causa interferencia en el inmunoensayo de trombina y, por lo tanto, indica que la interferencia detectada en el plasma (ejemplo 2) podría ser, por lo menos en parte, tomada en cuenta por la presencia de AT-III.

**Ejemplo 4 - El efecto beneficioso de la adición de hirudina en un inmunoensayo para detectar a trombina en plasma**

55 La hirudina es un péptido pequeño de 65 aminoácidos que ocurre naturalmente en sanguijuelas y tiene propiedades anticoagulantes. La hirudina se enlaza al lugar de enlace del fibrinógeno (el lugar de enlace de sustratos) en la trombina mientras que la AT-III se enlaza al lugar catalítico/lugar activo de la trombina. En el siguiente conjunto de experimentos, se examinó el efecto de la adición de hirudina en la interferencia de la AT-III en el inmunoensayo específico de trombina.

60 Con este propósito, se prepararon a soluciones diferentes que contenían AT-III [refiérase a las soluciones 1, 4 y 7 más adelante] y se mezclaron concentraciones diferentes de hirudina con las diferentes soluciones (refiérase a los grupos 2, 3, 5, 6, 8 y 9 más adelante). Luego se agregaron a diferentes concentraciones de trombina a las mezclas y se ejecutó al inmunoensayo.

65 Preparación de las soluciones 1-9:

1. AT-III (American Diagnostica; Número de catálogo 433) diluida en un amortiguador de bloqueo con una concentración final de 1 IU/mililitro.
- 5 2. Una solución tal como en 1 + hirudina (Sigma; Número de catálogo 94581) con una concentración final de 1 U/mililitro (1 U de hirudina corresponde a 1 ATU (unidad de antitrombina – antithrombin unit [ATU]; se define a 1 ATU como el monto de inhibidor que neutraliza a 1 unidad NIH de trombina).
3. Se agregó a una solución como en 1 + sólo hirudina con una concentración final de 5 U/mililitro.
- 10 4. Una solución como en 1 + heparina (Pharmacare) con una concentración final de 10 IU/mililitro. La heparina incrementa la desactivación de la trombina por la AT-III.
5. Una solución tal como en 4 + hirudina con una concentración final de 1 U/mililitro.
- 15 6. Una solución tal como en 4 + hirudina con una concentración final de 5 U/mililitro.
7. Plasma de cerdo.
8. Tal como en 7 + hirudina con una concentración final de 1 U/mililitro.
- 20 9. Tal como en 7 + hirudina con una concentración final de 5 U/mililitro.

Luego, se agregó trombina a cada solución (1-9) llegando a una concentración final de 4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156.7, 313.5, y 627 ng/mililitro en la forma ya indicada (refiérase a la sección de Materiales y Métodos). En este experimento, se agregó trombina a las soluciones 2, 3, 5, 6, 8 y 9 que contenían hirudina junto con AT-III.

Se diluyeron a las muestras preparadas (soluciones 1-9 mezcladas con las diferentes concentraciones de trombina), se pusieron con pipetas en una placa ELISA recubierta, y se determinaron los niveles OD tal como se indicó en la sección de materiales y métodos.

Se muestran a los valores OD de las diferentes muestras que contenían trombina en las figuras 4, 5 y 6. En la figura 4 la muestra es plasma de cerdo (muestras preparadas con las soluciones 7-9). En la figura 5, la muestra es una solución que comprende a AT-III (muestras preparadas con las soluciones 1-3). En la figura 6 la muestra es una solución que comprende a AT-III y a heparina (muestras preparadas con las soluciones 4-6).

Se observó que la adición de hirudina reduce, en una forma dependiente de las dosis, a la interferencia de AT-III en el inmunoensayo específico de trombina.

Estos resultados indican que para mejorar la detección de trombina por el inmunoensayo específico de trombina en una muestra que contiene a AT-III, es beneficioso agregar a la muestra examinada hirudina, una molécula pequeña capaz de enlazarse al lugar de enlace de sustratos de la trombina.

#### **Ejemplo 5 - El efecto beneficioso de la adición de hirudina en un inmunoensayo específico de trombina para detectar a trombina en plasma.**

Los resultados del experimento que se acaba de mencionar indican que la adición de hirudina a una muestra que contiene a AT-III mejora la detección de trombina en un inmunoensayo específico. En el experimento que se acaba de mencionar, se agregó trombina a muestras que contenían a hirudina junto con AT-III. Sin embargo, la muestra examinada de plasma ya contiene trombina, y la mayoría de la trombina está adherida a la anti-trombina III. En aquellos casos, la hirudina deberá actuar en un complejo de trombina-antitrombina-III. El siguiente experimento examina el efecto beneficioso de la hirudina en un inmunoensayo para la detección de trombina en una muestra de plasma que ya contiene trombina y antitrombina-III.

En el siguiente conjunto de experimentos, se cargaron varias concentraciones de trombina a muestras de plasma de cerdo (con concentraciones finales de 4.9 a 6.27 ng/mililitro; refiérase a la preparación de las muestras de la sección de Materiales y Métodos). Se prepararon 3 grupos de muestras. En el siguiente paso, se agregó hirudina en los dos grupos con una concentración final de 1 U/mililitro (■) o 20 U/mililitro (●). No se agregó hirudina al 3<sup>er</sup> grupo. Este grupo fue utilizado como control (▲). Se detectó a la trombina en los grupos diferentes mediante el ensayo de ELISA descrito anteriormente. En este experimento, se utilizó plasma de cerdo que no fue cargado suplementado con 5 U/mililitro de hirudina como un control negativo (no se mostraron a los resultados del control negativo). Se muestran a los resultados en la figura 7.

Se muestra al índice molar entre la hirudina agregada a la muestra y la trombina presente en la muestra en la tabla 1 a continuación.

5

10 Tabla 1: El índice molar entre la hirudina y la trombina en la muestra examinada.

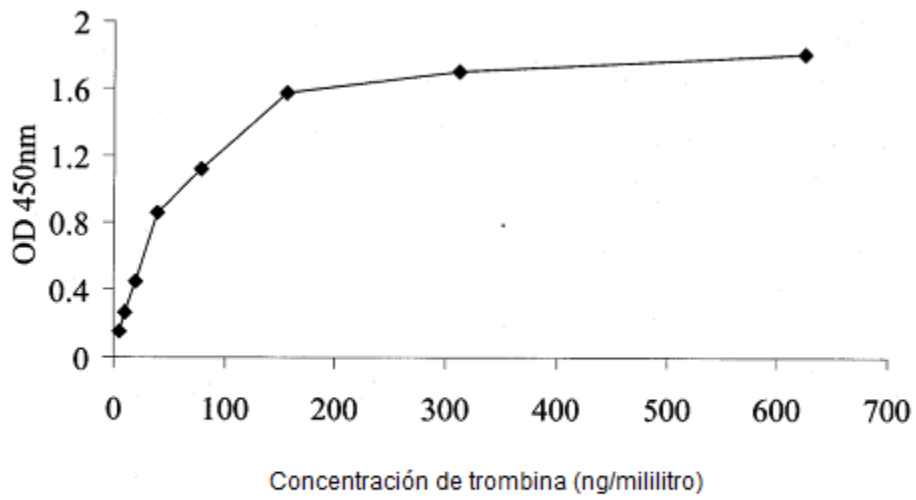
	Trombina co La s (ng/mililitro)	Trombina Se (unidad/mililitro)	Hirudina:trombina Índice molar cuando se agregó 1 ATU/mililitro de hirudina	Hirudina: trombina Índice molar cuando se agregó 20 ATU/mililitro de hirudina
15	4.9	0.01225	81.63	1632.65
20	9.8	0.0245	40.82	816.33
	19.6	0.049	20.41	410.26
	39.2	0.098	10.20	205.13
	78.4	0.196	5.10	102.56
	156.8	0.392	2.55	51.05
25	313.6	0.784	1.27	25.52
	600 27.2	1.568	0.64	12.76

\* 1 U de trombina es equivalente a alrededor de 400 ng/mililitro de trombina.

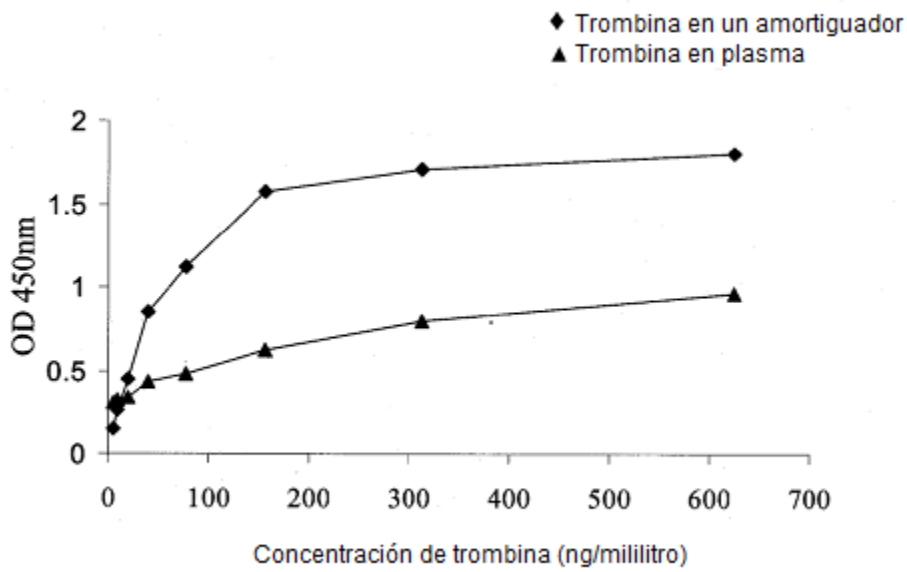
30 Se describió que la adición de hirudina a una muestra de plasma cargada con trombina resultó en un incremento de la capacidad de detectar trombina en el inmunoensayo que depende de la concentración de hirudina. Los resultados también demuestran que cuando el índice molar entre la hirudina y la trombina fue superior o igual a 0.637755, se observa un incremento en la capacidad del inmunoensayo para detectar a la trombina.

**REVINDICACIONES**

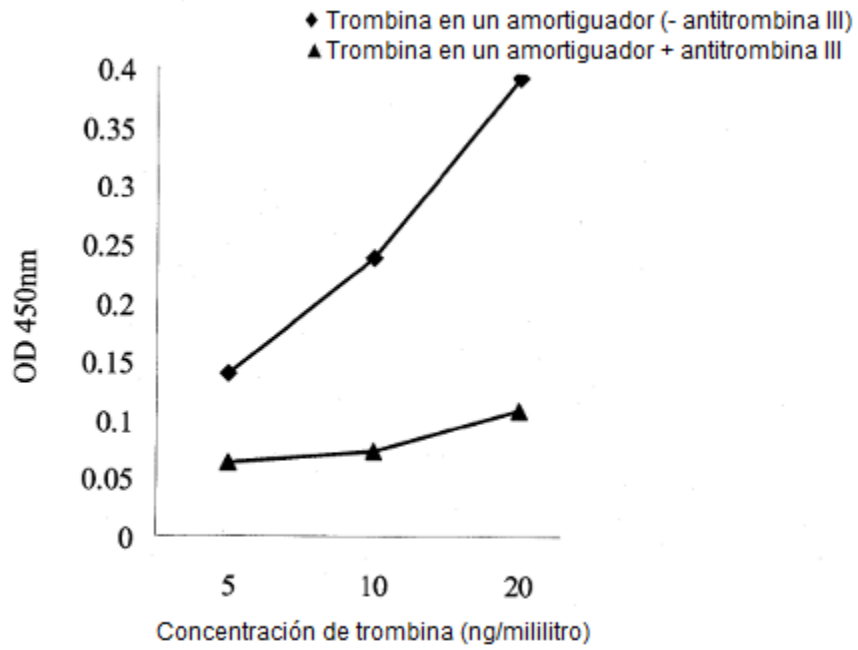
- 5 1. Un método in vitro para reducir la interferencia de la antitrombina III (AT-III) en un inmunoensayo para  
 10 cuantificar a la trombina en una muestra en la presencia de antitrombina III (AT-III), donde el inmunoensayo  
 comprende a los pasos de: contactar a la muestra con una molécula pequeña seleccionada de un grupo  
 que consiste de hirudina, que ocurre naturalmente, variaciones de hirudina sintética, derivados de hirudina,  
 15 variaciones recombinantes de hirudina, miméticos, y una de sus combinaciones, que reconocen el lugar de  
 enlace de sustratos de la trombina; agregar a la muestra un anticuerpo polidonal específico de la trombina  
 o uno de sus fragmentos, donde el anticuerpo específico de trombina es generado en contra de una  
 trombina que tiene a un lugar activo bloqueado mediante una molécula seleccionada de un grupo que  
 20 consiste de Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK - Phe-Pro-Arg-chloromethylketone), ácido 4-  
 aminofenilpirúvico (APPA - aminophenylpyruvic acid), fluoruro de bencenosulfonilo de 4-(2-aminoetilo)  
 (AEBSF - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride), y una de sus combinaciones; que comprende  
 además a
- (a) medir el enlace del anticuerpo en relación a la trombina y determinar el monto de trombina  
 presente; o
- (b) medir el nivel de anticuerpos enlazados,
- Donde el índice molar entre la hirudina y la trombina en esta muestra es mayor o igual que 0.64,
- Donde la interferencia de la antitrombina-III en el inmunoensayo es reducida en comparación a un  
 25 inmunoensayo de control realizado en la ausencia de la molécula pequeña.
2. El inmunoensayo de acuerdo a la reivindicación 1, donde la muestra es un espécimen biológico  
 seleccionado de un grupo que consiste de sangre o componentes sanguíneos.
3. El inmunoensayo de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, donde el inmunoensayo es un inmunoensayo de fase  
 30 sólida.
4. El inmunoensayo de acuerdo a la reivindicación 3, donde el inmunoensayo de fase sólida es un  
 inmunoensayo tipo emparejado.
5. El inmunoensayo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, donde la determinación del  
 35 monto de trombina se determina usando a una curva estándar de trombina.
6. Un botiquín para cuantificar la trombina en una muestra que contiene a antitrombina III (AT-III), donde el  
 40 botiquín comprende a:
- Un anticuerpo polidonal específico de trombina o uno de sus fragmentos; y
- Una molécula pequeña seleccionada de un grupo que consiste de hirudina, que ocurre naturalmente,  
 45 variaciones de hirudina sintética, derivados de hirudina, variaciones de hirudina recombinante, miméticos, y  
 una de sus combinaciones, que reconoce al lugar de enlace de sustratos de la trombina,
- Donde el anticuerpo específico de trombina es generado en contra de una trombina que tiene a un lugar  
 50 activo bloqueado por una molécula seleccionada de un grupo que consiste de Phe-Pro-Arg-clorometilcetona  
 (PPACK - Phe-Pro-Arg-chloromethylketone), ácido 4-aminofenilpirúvico (APPA - aminophenylpyruvic acid),  
 fluoruro de bencenosulfonilo de 4-(2-aminoetilo) (AEBSF - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride), y  
 una de sus combinaciones.
7. El botiquín de acuerdo a la reivindicación 6, donde el botiquín es un botiquín de inmunoensayos.
8. El botiquín de acuerdo a la reivindicación 6 o a la reivindicación 7, que contiene además a trombina  
 55 purificada.



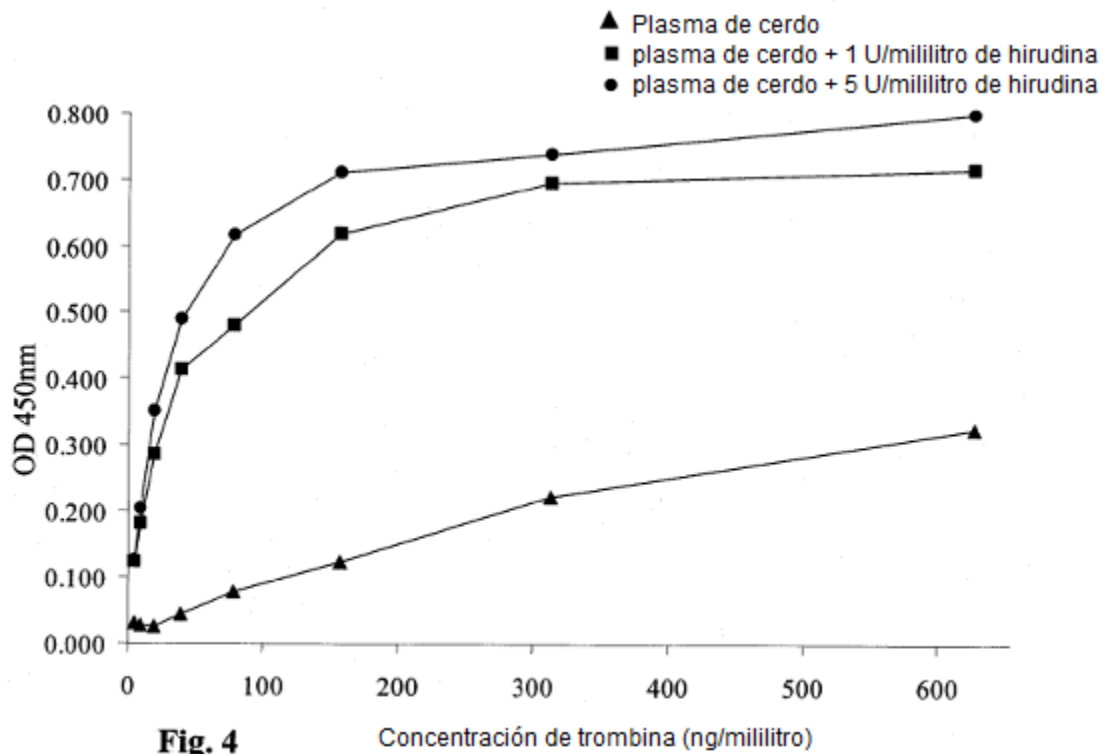
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

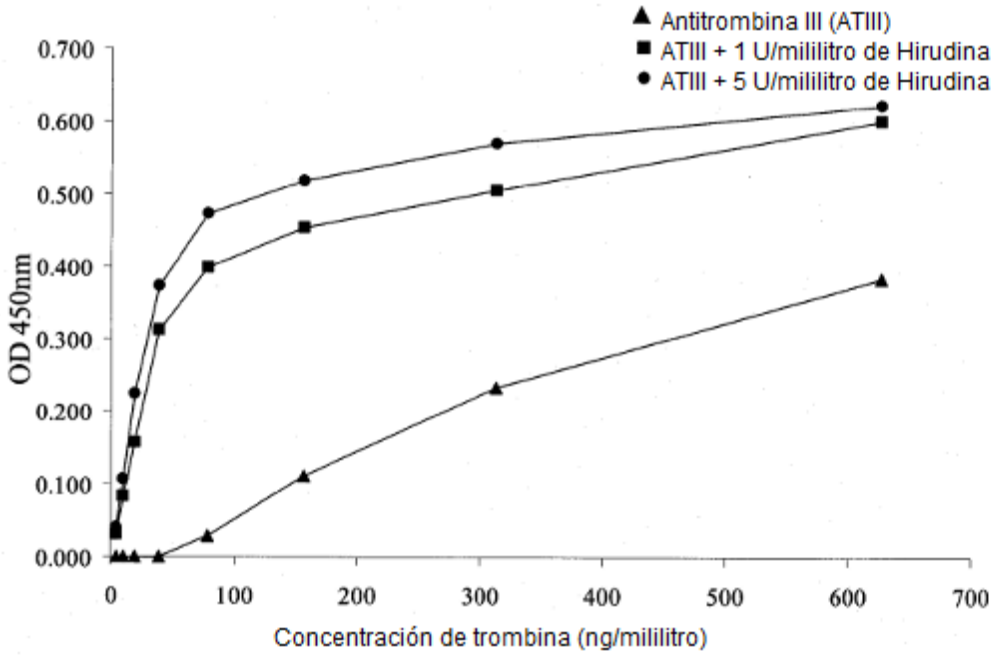


Fig. 5

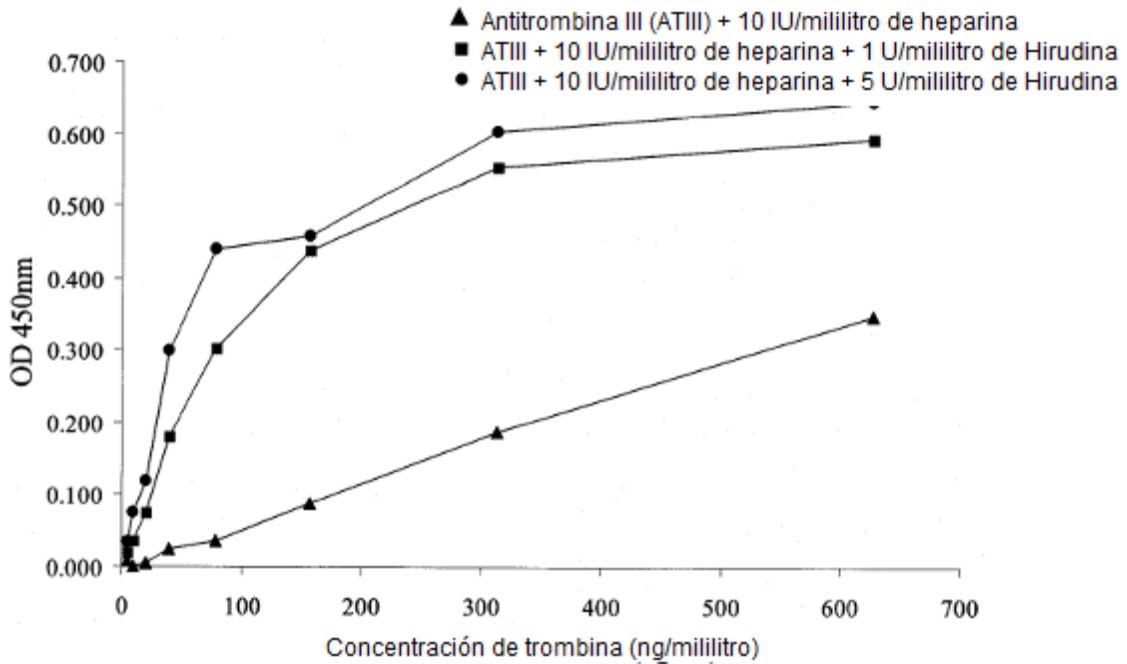
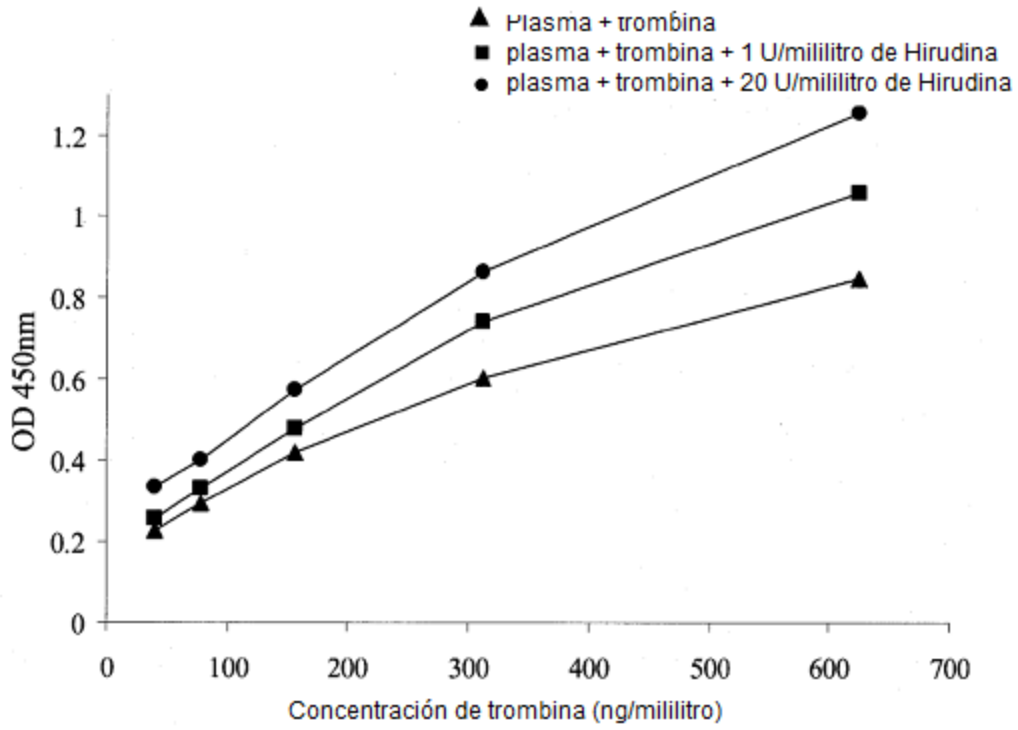


Fig. 6





**Fig. 7**