

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 028**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2007 PCT/JP2007/073854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2008 WO08072621**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07850416 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2103938**

54 Título: **Método de medición inmunológica para el precursor del péptido liberador de gastrina**

30 Prioridad:

11.12.2006 JP 2006333072

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

14.02.2017

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)

100 Abbott Park Road

Abbott Park, IL 60064-3500, US

72 Inventor/es:

YOSHIMURA, TORU;

FUJITA, KENJU y

DOWELL, BARRY L.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 601 028 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de medición inmunológica para el precursor del péptido liberador de gastrina5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de análisis en el que se utiliza plasma como muestra y la estabilidad de la muestra se mejora notablemente en un sistema para la detección de ProGRP (pro-péptido liberador de gastrina) mediante un inmunoanálisis.

10

Técnica anterior

Se ha conocido la utilidad de la relación entre el cáncer de pulmón y la concentración de péptido liberador de gastrina en sangre (GRP) como informaron también Yamaguchi et al. (véase el documento JP-A-6-98794 (expedido como documento JP3210994B)). Sin embargo, el GRP es una sustancia fisiológicamente activa y pierde su actividad en un período de tiempo extremadamente corto en suero o plasma. Por lo tanto, era difícil de usar prácticamente como un inmunoanálisis. Yamaguchi et al. encontraron que la estabilidad del antígeno suficiente para soportar el uso práctico como un inmunoanálisis se puede lograr analizando específicamente, entre tres tipos de pro-péptidos liberadores de gastrina (ProGRP), que son precursores de GRP, una secuencia de aminoácidos de los residuos 31-98 (ProGRP 31-98) que no contiene una región fisiológicamente activa (una secuencia de aminoácidos de los residuos 1-27) y es una región común a los tres tipos, y se encontró que es útil para el diagnóstico del cáncer de pulmón (véase el documento JP-A-6-98794 (expedido como JP3210994B)). De acuerdo con este método, ProGRP puede existir de forma estable en suero o plasma igualmente hasta 6 horas, por lo tanto, se hizo posible ponerlo en práctica como un método de inmunoanálisis. Adicionalmente, dado que no se obtiene en particular una ventaja de la utilización de plasma, el suero que se utiliza generalmente para el análisis de un marcador de cáncer ha llegado a ser utilizado como muestra.

Véase el documento JP-A-6-98794 (expedido como JP3210994B) HOLST J J ET AL, ELEVATED PLASMA CONCENTRATIONS OF C-FLANKING GASTRIN-RELEASING PEPTIDE IN SMALL-CELL LUNG CANCER, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, VOL. 7, NR. 12, PÁGINA(S) 1831-1838, ISSN 0732-183X, XP009131797 [X] 1-4,6-8 par. 2, c. 1, pág. 1832 [I] 9-11 [Y] 5 describe un radioinmunoanálisis que mide GRP, PRO_GRP en plasma de pacientes con cánceres de pulmón de células pequeñas.

35 **Descripción de la invención****Problemas a resolver por la invención**

Sin embargo, la estabilidad de ProGRP 31-98 es aún inferior a un antígeno general que se va a utilizar en un inmunoanálisis. Un grado aceptable de disminución en la actividad de ProGRP 31-98 en una muestra parece variar dependiendo de su fabricante. Sin embargo, en el caso de Immuchek F-ProGRP disponible de Sysmex Corporation, se permite que una muestra sea almacenada bajo refrigeración durante un máximo de 3 horas, en el caso de un kit de análisis de ProGRP Serumlabo (marca registrada) disponible de Fujirebio Inc., se permite que una muestra sea almacenada bajo refrigeración durante un máximo de aproximadamente 24 horas (una de ellas es un agente de diagnóstico que ya ha sido aprobado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Social), y ambos productos no permiten el almacenamiento a temperatura ambiente. Además, se interpretará que las estabilidades de los mismos en plasma y suero son iguales, por lo tanto, solamente se ha puesto en uso práctico un análisis que utiliza suero. En caso de que se almacene una muestra de suero durante 3 horas a más de 24 horas, es necesario congelar la muestra. Por lo tanto, se requieren tareas de descongelación de la muestra antes de su uso, que eliminen la materia depositada generada por la congelación y descongelación mediante centrifugación antes de su análisis, y por consiguiente, tal estabilidad insuficiente de la muestra redujo significativamente la eficiencia de trabajo. Además, muchos de los antígenos que incluyen marcadores de cáncer típicos tales como CEA, AFP y CA 19-9, que son analizados inmunológicamente, puede existir en forma estable hasta después de 7 días de almacenamiento con refrigeración. Por lo tanto, sólo en caso de que se lleve a cabo este análisis, se requieren operación y lugar de almacenamiento especiales, y por consiguiente, esto también se ha convertido en una causa que reduce la eficiencia de la prueba en su conjunto.

Se ha interpretado que la razón por la que la estabilidad de la muestra de ProGRP 31-98 es baja se debe a que el peso molecular de la misma es bajo. Adicionalmente, debido a que no se observó una diferencia significativa entre los valores de análisis de ProGRP 31-98 en suero y plasma en el intervalo de hasta 6 horas, en el que sólo se observó una ligera disminución de la actividad del mismo incluso en suero, no se consideró que hubiera una diferencia en estabilidades entre suero y plasma.

Medios para resolver los problemas

El ProGRP es una proteína que tiene un peso molecular de 8.000 a 10.000, y un dominio de una secuencia de aminoácidos de los residuos 31-98 con el que se lleva a cabo un análisis en un inmunoanálisis de ProGRP 31-98 tiene un peso molecular de aproximadamente 7800. Se sabe que la estabilidad de la muestra de una molécula de péptido que tiene un bajo peso molecular es baja como un hecho general, y se puede entender que no se haya informado sobre un estudio que examine la causa de la baja estabilidad de la muestra de ProGRP. Sin embargo, incluso en caso de que se vaya a utilizar como agente de inmunodiagnóstico uno de peso molecular bajo como la insulina (peso molecular: 5800) o similares, existe una molécula de péptido que puede existir de manera estable en suero o plasma durante más de 5 días en almacenamiento con refrigeración, por lo tanto, el autor de la presente invención cree que debe haber algún tipo de mecanismo para la inestabilidad de la muestra, que es único para ProGRP, además de su bajo peso molecular.

Los autores de la presente invención pensaron que debido a que la molécula de ProGRP per se puede existir de forma estable en el almacenamiento con refrigeración durante más de aproximadamente 1 semana, no es atribuible únicamente al propio ProGRP que se vuelve inestable en una muestra, y puede haber una sustancia que esté presente en la sangre y lo vuelva inestable. Además, el autor de la presente invención cree que debido a que una porción de GRP que es una región fisiológicamente activa (una secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 27) no está ya contenida en ProGRP 31-98, puede haber una posibilidad de que algún tipo de reacción que no sea una reacción que se produce in vivo provoque la inestabilidad de la muestra única de ProGRP.

Como se ha descrito en un libro normalizado, cuando la sangre sale del cuerpo, se activan más de 10 sustancias denominadas factores de coagulación de la sangre y factores fibrinolíticos, y estas sustancias respectivas inducen la degradación o activación de moléculas precursoras de los factores de coagulación de la sangre, y por último, inducen la activación de la trombina generada por la degradación de la protrombina y la formación de fibrina generada por la reacción de degradación del fibrinógeno por trombina para coagular de esta manera la sangre, que es un hecho bien conocido. Un componente líquido obtenido mediante la eliminación de una porción coagulada en este momento da como resultados el suero. La mayoría de los activadores de tales factores de coagulación de la sangre son proteasas, incluyendo la trombina y existen en el suero. En el plasma, no se causa la activación de la trombina, y adicionalmente, no se causa la activación de varios factores de coagulación de la sangre, aunque esto depende del anticoagulante. Es decir, en el suero, existen activadores y degradadores de los factores de coagulación de la sangre y factores fibrinolíticos a un nivel superior en el suero que en vivo o en el plasma. Por lo tanto, los autores de la presente invención suponen que puede haber una relación entre tal sustancia que existe en el suero y no existe o existe solamente a un nivel bajo in vivo y la inestabilidad de ProGRP 31-98.

De acuerdo con esta suposición, el autor de la presente invención examinó una disminución en la actividad de la trombina, que es un activador de un factor de coagulación de la sangre, mediante la adición a una solución de ProGRP, y observó una disminución significativa en la actividad de ProGRP en la solución con la adición de trombina. De acuerdo con ello, se encontró que la trombina, que es un activador de un factor de coagulación de la sangre, es una de las causas de la disminución en la actividad de ProGRP.

El autor de la presente invención examinó la estabilidad de ProGRP mediante el uso de plasma como una muestra con el uso de la propiedad de que existen activadores de los factores de coagulación de la sangre a un nivel alto en el suero y no existen o existen sólo a un nivel bajo in vivo o en el plasma, y lograron mejorar notablemente la estabilidad de la muestra de ProGRP, por lo tanto se ha completado la presente invención. Es posible recoger plasma de la sangre de una manera similar al suero, y el plasma se puede recoger de la sangre de una manera sustancialmente similar a la del suero, y se puede utilizar en un inmunoanálisis sin ningún problema. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, mediante la adición de un inhibidor o un inactivador de tal activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico a una muestra de suero, se puede obtener un efecto similar.

[Constitución de la invención]

La presente invención proporciona, basándose en los hallazgos mencionados anteriormente, un método para analizar ProGRP en una muestra de suero, comprendiendo el método añadir a una muestra de suero que contiene ProGRP obtenido de un sujeto, un inhibidor o un activador de un activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico; y analizar la muestra de suero para determinar la región ProGRP 31-38.

Asimismo, la presente invención proporciona un método para mejorar la estabilidad de ProGRP en una muestra de suero que contiene ProGRP que comprende la etapa de añadir una muestra de suero que contiene ProGRP obtenido de un sujeto, un inhibidor o un activador de un activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de una composición, en donde dicha composición comprende un inhibidor o un activador de un activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico para estabilizar ProGRP en suero.

De este modo, se puede lograr un método de análisis de ProGRP con un análisis más conveniente y más exacto que un método convencional utilizando una muestra de suero en condiciones que las que no se active el factor de coagulación de la sangre, con lo que no se ocasiona la formación de fibrina y no se produce la coagulación de la sangre.

5 Es decir, de acuerdo con la invención, es posible obtener un efecto añadiendo una sustancia que inactive el factor de coagulación al suero antes de recoger el suero, retirando un factor de coagulación, o disminuyendo su actividad.

10 Es apropiado emplear la presente invención en un método de inmunoanálisis, sin embargo, la presente invención también se puede emplear en un sistema de análisis para realizar un análisis ProGRP.

[Ventaja de la invención]

15 De acuerdo con la presente invención, una muestra de suero se puede almacenar de forma estable durante un largo período de tiempo. El período de almacenamiento de la misma en el almacenamiento con refrigeración se puede prolongar de 3 a 24 horas en un método convencional a aproximadamente 1 semana. Adicionalmente, también es posible almacenar una muestra a temperatura ambiente.

20 De acuerdo con la presente invención, no es necesario crioconservar una muestra de suero ni siquiera en el caso en el que el tiempo de almacenamiento de la muestra sobrepase de 3 a 24 horas. Por lo tanto, no son necesarias las labores de descongelación de la muestra antes de su uso cuando se congela la muestra, que eliminan la materia depositada generada por congelación y descongelación mediante centrifugación, y por consiguiente, la eficiencia de trabajo se puede mejorar significativamente. Adicionalmente, se hace posible almacenar una muestra durante 1 semana para lo cual muchos de los otros antígenos que se van a analizar inmunológicamente se pueden almacenar
25 de forma estable en el almacenamiento con refrigeración, por lo tanto, no se requiere una operación de almacenamiento y el lugar de almacenamiento especial de una muestra de suero para el análisis de ProGRP.

30 Adicionalmente, la presente invención mejora la estabilidad a largo plazo de una muestra de suero en la crioconservación, y por otra parte, mejora su estabilidad a temperatura ambiente, por lo tanto, se pueden omitir los trabajos de realización de la separación o el almacenamiento del suero en condiciones de refrigeración. Adicionalmente, en la presente invención, se puede suprimir la disminución en la actividad durante la operación a temperatura ambiente que no se puede evitar durante el procedimiento de la operación de recogida de sangre a la finalización del análisis. Por lo tanto, se hace posible analizar los valores de ProGRP con más precisión.

35 Se considera que el grado de inestabilidad de ProGRP en suero varía entre los pacientes como una cuestión de rutina. Por consiguiente, es concebible que en el caso de un método convencional utilizando suero como muestra, mediante la disminución de la actividad de antígeno ProGRP durante el proceso de separación o almacenamiento de suero, el suero muestre un valor negativo en el análisis a pesar de que esencialmente tiene ProGRP correspondiente a un valor positivo. Se considera que tal aparición de resultados de la prueba falsos negativos para
40 la actividad del antígeno se puede evitar mediante el empleo de la presente invención, y por lo tanto se puede mejorar la sensibilidad de detección de cáncer de pulmón de células pequeñas.

45 Dicho sea de paso, por lo que se refiere al procedimiento de análisis de ProGRP, existen diversos documentos, sin embargo, por lo que se refiere a un ejemplo en el que se usa plasma como muestra, sólo existe un informe de Yamaguchi et al. Sin embargo, este informe sólo conduce a la conclusión de que el suero y el plasma son iguales en términos de estabilidad de la muestra, y no sugiere en absoluto la superior utilidad del plasma en oposición al suero tratado. Adicionalmente, se muestran a continuación documentos que describen los estudios de estabilidad implicados en otras sustancias entre el suero y el plasma, sin embargo, resulta obvio que no sugieren en absoluto el
50 método de análisis de la presente invención.

55 Yamaguchi et al. (Patente Japonesa Núm. 3210994) encontraron una relación entre ProGRP 31-98 y el diagnóstico de cáncer de pulmón y muestran que se puede utilizar una muestra de plasma de la misma manera que una muestra de suero hasta un tiempo de almacenamiento de 6 horas. Sin embargo, no hay descripción de la superioridad de una muestra de plasma en términos de la estabilidad de almacenamiento. Es un trabajo comúnmente realizado en un inmunoanálisis que se muestre la equivalencia entre el plasma y el suero como una muestra sometida a un inmunoanálisis mediante el uso de plasma y suero, y la constitución de la invención de esta solicitud no es fácilmente inferible a partir de este documento ni siquiera por los expertos en la técnica.

60 Evans et al. (Clinical Biochemistry Vol. 34, págs. 107-112, 2001) examinaron la estabilidad de una hormona que tiene una actividad fisiológica en suero y plasma y han informado de que la del suero y el plasma es mejor en términos de que la estabilidad de la hormona varía dependiendo del tipo de hormona. Esto demuestra que desde el punto de vista de la estabilidad de una sustancia de ensayo, una muestra de suero puede ser bastante mejor que una muestra de plasma, lo que evita en cambio que los expertos en la técnica lleguen a la presente invención de esta solicitud.

Boyanton et al. (Clinical Chemistry Vol. 48, págs. 2242-2247, 2002) estudiaron las estabildades de 24 tipos de sustancias en suero y plasma. Mostraron que en cualquiera de los casos de suero y plasma, cuando se llevó a cabo la separación en suero o la separación en plasma de células sanguíneas inmediatamente después de la recogida de la sangre, las sustancias podrían existir de forma estable durante 58 horas o más en cualquiera de suero y plasma. Además, se concluyó que cuando no se llevó a cabo la separación, la estabilidad de las sustancias fue mejor en el suero. En este documento, no existe una descripción relacionada con ProGRP y también llegó a la conclusión de que la estabilidad es mejor en el suero, por lo tanto, no tenemos ninguna duda de que la invención de los autores de la presente invención es novedosa.

Adicionalmente, en la actualidad, han sido aprobados tres tipos de agentes de diagnóstico de ProGRP por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar y están disponibles en el mercado y son utilizados en los campos clínicos (la cobertura médica comenzó en 1996). Sin embargo, no existe ningún informe de que la estabilidad de ProGRP 31-98 en plasma sea mejor que en suero. Por lo tanto, se puede decir que esto es una clara evidencia que muestra que la presente invención es novedosa.

La invención de esta solicitud de que la estabilidad de una muestra mejora mediante el uso de una muestra en un estado en el que no se produce coagulación de la sangre es una invención novedosa en base a un mecanismo que es totalmente diferente de cualquier técnica anterior, y presenta un efecto que no se podría esperar en la técnica anterior.

[Ejemplos]

Ejemplo 1. Relación entre la inestabilidad del antígeno ProGRP y la trombina

Se añadió aminoácido de antígeno ProGRP 31-98 (obtenido de Abbott Laboratories en EE.UU.) sintetizado por medio del método Fmoc a una solución de tampón fosfato que contenía albúmina de suero bovino al 1% y cloruro de calcio 2 mM. Se añadió a esto adicionalmente trombina (fabricada por Sigma-Aldrich Co.) y después de almacenar la mezcla a temperatura ambiente, se analizó la concentración de ProGRP usando un ProGRP Architect. Los resultados del análisis se muestran en la Fig. 1. A partir de la Fig. 1, debido a que se observa degradación de ProGRP en presencia de trombina, se sugiere que la trombina está relacionada como una causa importante de la degradación de ProGRP en suero. La trombina es el activador del factor de coagulación de la sangre II y es una sustancia que existe en suero a un alto nivel. Los detalles del método de análisis Architect se describen en el Ejemplo 3.

Ejemplo 2. Estabilización de ProGRP mediante la adición de PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo)

Después de añadir PMSF (fabricado por Sigma-Aldrich Co.) a suero, se añadió a esto aminoácido de antígeno ProGRP 31-98 sintetizado por medio del método Fmoc. Después de almacenar la mezcla a temperatura ambiente, la concentración de ProGRP se analizó utilizando el ProGRP Architect. Los resultados del análisis se muestran en la Fig. 2. A partir de la Fig. 2, Se ha encontrado que una disminución en la actividad de ProGRP se suprimió significativamente en presencia de PMSF. El PMSF es una sustancia que se utiliza para inactivar la actividad de una enzima serina proteasa tal como la trombina y se puede considerar que la presencia de una proteasa tal como la trombina es la causa de la inactivación de ProGRP.

Ejemplo 3. La estabilización de antígeno ProGRP usando plasma

Se añadió antígeno ProGRP 31-98 (obtenido de Abbott Laboratories en EE.UU.) sintetizado por medio del método Fmoc para cada uno de suero y plasma EDTA obtenidos del mismo donante de sangre y las mezclas se utilizaron como muestras de análisis. Después de que las muestras de análisis se almacenaron bajo refrigeración durante 1 día, 3 días o 7 días, o se almacenaron durante 1 día a temperatura ambiente, se analizó la concentración de ProGRP. Para el análisis de la concentración de ProGRP, se utilizaron kit de análisis Serumlabo (marca registrada) ProGRP (Fujirebio Inc.) y ProGRP Architect descritos a continuación. Los resultados del análisis se muestran en la Fig. 3 a la Fig. 7.

Tanto ProGRP Serumlabo como ProGRP Architect son un método de análisis de la concentración de ProGRP 31-98 que utiliza un inmunoanálisis y los resultados del análisis de ambos fueron equivalentes. En ambos casos, cuando se permitió que existiera antígeno ProGRP en plasma, se observó una mejora significativa de la estabilidad de la muestra en comparación con el caso del suero. Esta mejora significativa de la estabilidad se puede observar no sólo en el almacenamiento con refrigeración, sino también en el almacenamiento a temperatura ambiente.

Aunque ProGRP se puede almacenar de forma estable durante 1 día (hasta el día siguiente) bajo la condición de almacenamiento con refrigeración en el método que utiliza suero, éste se puede almacenar de forma estable durante 1 semana o más en el caso en el que se utiliza plasma. Se calcula que el tiempo requerido para que una proporción residual muestre 90% cuando una proporción residual de ProGRP es aproximada como proporción residual ProGRP

= e^{kt} (e: log natural, k: constante numérica, t: tiempo) de acuerdo con una fórmula de aproximación para una proporción de inactivación de una sustancia general mostrada por Evans et al. (Clinical Biochemistry, vol. 34, pág. 107-112, 2001) es de 10,25 días en condiciones de refrigeración cuando se utiliza el valor de análisis de una muestra almacenada bajo refrigeración durante 7 días utilizando un kit de análisis ProGRP Serumlabo (marca registrada). De una manera similar, se calcula que el tiempo es de 1,26 días en el caso del suero (se utiliza para el cálculo el valor de análisis de una muestra de suero almacenada en condiciones de refrigeración durante 1 día utilizando un kit de análisis ProGRP Serumlabo (marca registrada)). Por lo tanto, se encuentra que en el caso en el que se utiliza plasma, se puede obtener la estabilidad del mismo aproximadamente 8 veces tan alta como la de suero.

En los métodos disponibles en la actualidad utilizando suero, no se puede almacenar una muestra de ProGRP de forma estable a temperatura ambiente. En el caso en el que se utiliza plasma, se puede almacenar de forma estable durante 24 horas o más. Se calcula que el tiempo requerido para que una proporción residual muestre 90% cuando una proporción residual de ProGRP es aproximada como proporción residual $ProGRP = e^{kt}$ (e: log natural, k: constante numérica, t: tiempo) es de 58 horas cuando se utiliza el valor de análisis de una muestra almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas utilizando Serumlabo, y es posible almacenar de forma estable una muestra hasta aproximadamente 2 días, incluso en almacenamiento a temperatura ambiente.

Método de análisis ProGRP Architect:

Un anticuerpo anti-ProGRP 31-98 (un anticuerpo obtenido de acuerdo con el método descrito en la Patente Japonesa Núm. 3210994) se unió a una micropartícula magnética modificadas con grupos carboxilo (obtenida de Abbott Laboratories en EE.UU.) por medio de un método que utiliza EDC hidrocioruro de (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (fabricado por Sigma-Aldrich Co.) y se preparó una micropartícula con anticuerpo en fase sólida. A continuación mediante la adición del anticuerpo en fase sólida de micropartículas a una solución tampón de Tris-HCl que contenía Tween 20 (fabricada por Kanto Chemical Co., Inc.), EDTA (sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético) y cloruro de sodio, se preparó una solución de micropartículas en fase sólida de anticuerpo.

El anticuerpo anti-ProGRP 31-98 (un anticuerpo obtenido de acuerdo con el método descrito en la Patente Japonesa Núm. 3210994) se marcó con un derivado de acridinio (obtenido de Abbott Laboratories en EE.UU.), y a continuación añadiéndolo a una solución de tampón MES que contenía un tensioactivo y albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Co.), se preparó una solución de marcaje.

Para un análisis para determinar la concentración de ProGRP, se utilizó un analizador de inmunoanálisis totalmente automático Architect (fabricado por Abbott Japón Co., Ltd.). Se mezclaron 50 μ l de la solución de micropartículas en fase sólida de anticuerpo con 50 μ l de una muestra y se inició una primera reacción. Durante la primera reacción, el antígeno ProGRP se une a la partícula magnética en fase sólida de anticuerpos y la cantidad unida corresponde a la concentración de ProGRP en la muestra. Después de 18 minutos, mientras se sostiene con un imán, la partícula magnética en fase sólida de anticuerpo se lavó con una solución de tampón fosfato dedicado a este dispositivo y se añadieron adicionalmente a esto 50 μ l de la solución de marcaje y la reacción continuó durante 4 minutos adicionales. Mediante esta reacción, el anticuerpo marcado se une a ProGRP sobre la partícula magnética. Debido a que la cantidad de anticuerpo marcado unido se corresponde con la cantidad de ProGRP sobre la partícula magnética, si la concentración de ProGRP en la muestra es baja, una pequeña cantidad de anticuerpo marcado da como resultado la unión a la partícula magnética y si la concentración de ProGRP en la muestra es alta, una gran cantidad de anticuerpo marcado da como resultado la unión a la partícula magnética.

A continuación, después de llevar a cabo el lavado con la solución de tampón de fosfato dedicada a este dispositivo, se observó una señal de luminiscencia utilizando un reactivo de luminiscencia de predisparo y un reactivo de disparo dedicado a este dispositivo. Mediante el uso de una solución con una concentración conocida preparada por separado como una solución patrón, se preparó una curva patrón por medio del método logístico de cuatro parámetros, y mediante el cálculo de una señal obtenida a partir de la muestra en la concentración de ProGRP, se determinó la concentración de ProGRP en la muestra.

Ejemplo 4. Comparación de una variedad de tipos de plasmas

El ProGRP recombinante 31-98 obtenido acuerdo con el método descrito en la Patente Japonesa Núm. 3210994 se añadió a cada una de diferentes muestras de plasma con EDTA, plasma con heparina de litio, plasma con ácido cítrico, plasma con heparina de sodio y suero obtenido del mismo donante de sangre y las mezclas se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 horas o se almacenaron bajo refrigeración durante 7 días y se analizó la concentración de ProGRP de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 3. A partir del valor de análisis de la muestra dejada a temperatura ambiente durante 24 horas, se restó el valor de análisis de 0 horas, y el valor resultante se tomó como una proporción residual de ProGRP después de almacenamiento a temperatura ambiente durante 24 horas. A partir del valor de análisis de la muestra almacenada bajo refrigeración durante 7 días, se restó

el valor de análisis de 0 horas, y el valor resultante se tomó como una proporción residual de ProGRP después de un almacenamiento con refrigeración de 7 días.

5 En la Fig. 7, se muestra la proporción residual de ProGRP en cada plasma después de un almacenamiento con refrigeración de 7 días. En la Fig. 8, la proporción residual de ProGRP en cada plasma después de un almacenamiento a temperatura ambiente durante 24 horas. A partir de las Figs. 7 y 8, las proporciones residuales de ProGRP son significativamente más altas en cualquiera de los plasmas en comparación con el suero y, en otras palabras, es evidente que la estabilidad de la muestra mejora significativamente en cualquiera de los plasmas. Además, debido a que las proporciones residuales están casi un 100% en almacenamiento con refrigeración de 7 días en el plasma, es evidente que casi toda la cantidad de ProGRP se almacena de forma estable en el plasma hasta 7 días bajo refrigeración.

Ejemplo 5. Transcurso de tiempo

15 Se añadió aminoácido de antígeno ProGRP 31-98 sintetizado mediante el método Fmoc a cada una de las muestras emparejadas de plasma con EDTA y suero obtenidas del mismo donante de sangre y las mezclas se almacenaron a temperatura ambiente o bajo refrigeración y se analizó la concentración de ProGRP mediante el método descrito en el Ejemplo 3. Los valores de hasta 24 horas se muestran por el promedio de 3 donantes y los valores de hasta 72 horas se muestran por el promedio de 2 donantes. Las proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento con refrigeración y las proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento a temperatura ambiente se muestran en la Fig. 9 y la Fig. 10, respectivamente. Los tiempos de almacenamiento mostrados en los dibujos son 0, 1, 3, 6, 7, 9 y 24 horas (tanto de almacenamiento con refrigeración como de almacenamiento a temperatura ambiente hasta este momento) y 72 horas (solamente de almacenamiento con refrigeración).

25 A partir de la Fig. 9, como muestran Yamaguchi et al., en el almacenamiento con refrigeración, el suero y el plasma tienen una estabilidad de ProGRP equivalente en un almacenamiento de hasta 6 horas. Sin embargo, la diferencia se hace poco a poco significativa después de 6 horas, y cuando una muestra de ProGRP se almacena durante 24 horas o más, el plasma aparentemente puede mostrar una mejor estabilidad que el suero.

30 A partir de la Fig. 10, en el almacenamiento a temperatura ambiente, ya se ha producido una diferencia significativa en la estabilidad de ProGRP entre el suero y el plasma en el momento en que se exceden las 3 horas. Además, cuando una muestra se almacena durante 6 horas o más, es obvio que el plasma puede mostrar aparentemente mejor estabilidad de almacenamiento que el suero. En el caso en el que ProGRP se almacena en el suero, la actividad de ProGRP disminuye a aproximadamente 80% en el momento del almacenamiento durante 6 horas. Cuando una muestra se almacena para el propósito de un agente de diagnóstico, en general, el límite aceptable es una actividad residual de hasta 90% (una disminución en la actividad de 10%). Debido a que en el caso en el que una muestra se almacena a temperatura ambiente en suero, la actividad de ProGRP disminuye a aproximadamente 80% en el momento de almacenamiento de 6 horas, se puede decir que el resultado mostrado en la Fig. 10 es coherente con el contenido de la descripción en el kit de análisis de ProGRP Serumlabo (marca registrada) y el kit de Immucheck F-ProGRP de los productos aprobados que no permiten el almacenamiento a temperatura ambiente. Por otro lado, en el caso en el que ProGRP se almacena en plasma, la proporción residual de actividad es de aproximadamente 90%, incluso en el caso en el que se almacena durante 24 horas, incluso en almacenamiento a temperatura ambiente, por lo tanto, se considera que se puede lograr el almacenamiento estable hasta aproximadamente 24 horas. Yamaguchi et al. muestran que el plasma se puede utilizar dentro del rango que permite que ProGRP exista de forma estable en el suero, sin embargo, la presente invención es diferente de la invención de Yamaguchi et al. en el punto de que la estabilidad de almacenamiento de ProGRP en una muestra de sangre que es suficiente para que sea utilizado con el propósito de un agente de diagnóstico puede fijarse incluso en unas condiciones de almacenamiento o durante un tiempo de almacenamiento en los que ProGRP no puede existir de forma estable en el suero y se considera que se puede demostrar la utilidad de la presente invención.

50 **[Breve descripción de los dibujos]**

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento a temperatura ambiente en presencia o ausencia de trombina o en suero.

55 [Fig. 2] La Fig. 2 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento a temperatura ambiente en suero con o sin adición de PMSF.

[Fig. 3] La Fig. 3 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento con refrigeración en suero o plasma.

[Fig. 4] La Fig. 4 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento a temperatura ambiente en suero o plasma.

60 [Fig. 5] La Fig. 5 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento con refrigeración en suero o plasma.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento a temperatura ambiente en suero o plasma.

Fig. 7] La Fig. 7 muestra relaciones residuales de ProGRP después del almacenamiento con refrigeración durante 7 días en suero o plasma.

[Fig. 8] La Fig. 8 muestra proporciones residuales de ProGRP después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 24 horas en suero o plasma.

5 [Fig. 9] La Fig. 9 muestra proporciones residuales de ProGRP en el almacenamiento con refrigeración en suero o plasma.

[Fig. 10] La Fig. 10 muestra proporciones residuales de ProGRP en almacenamiento a temperatura ambiente en suero o plasma.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar ProGRP en una muestra de suero, comprendiendo el método:
añadir a una muestra de suero que contiene ProGRP obtenido de un sujeto un inhibidor o un inactivador de un
5 activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico; y
analizar la muestra de suero para determinar región 31-98 de ProGRP.
2. El método de análisis de ProGRP de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor o un inactivador del
10 activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico es fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
3. El método de análisis de ProGRP de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor o un inactivador de
un activador de un factor de coagulación de la sangre o factor fibrinolítico se añade a un recipiente de recogida de la
muestra después de que la muestra de suero se haya añadido al recipiente de recogida de la muestra.
- 15 4. El método de análisis de ProGRP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se utiliza
un método de inmunoanálisis.
5. El método de análisis de ProGRP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se
20 analiza una muestra de suero que se ha dejado o se ha almacenado a temperatura ambiente después de la
recogida.
6. Un método para mejorar la estabilidad de ProGRP en una muestra de suero que contiene ProGRP que
comprende la etapa de añadir a una muestra de suero que contiene ProGRP obtenido de un sujeto un inhibidor o un
25 inactivador de un activador de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho inhibidor o inactivador de un activador de un factor de
coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico es fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- 30 8. El método de la reivindicación 6, en donde dicho inhibidor o un inactivador de un activador de un factor de
coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico se añade a un recipiente de recogida de la muestra después de que
el suero se haya añadido al recipiente de recogida de la muestra.
9. El uso de una composición, en donde dicha composición comprende un inhibidor o un inactivador de un activador
de un factor de coagulación de la sangre o un factor fibrinolítico para estabilizar ProGRP en el suero.
- 35 10. El uso de la reivindicación 9, en donde dicho inhibidor o inactivador de un activador de un factor de coagulación
de la sangre o un factor fibrinolítico es fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

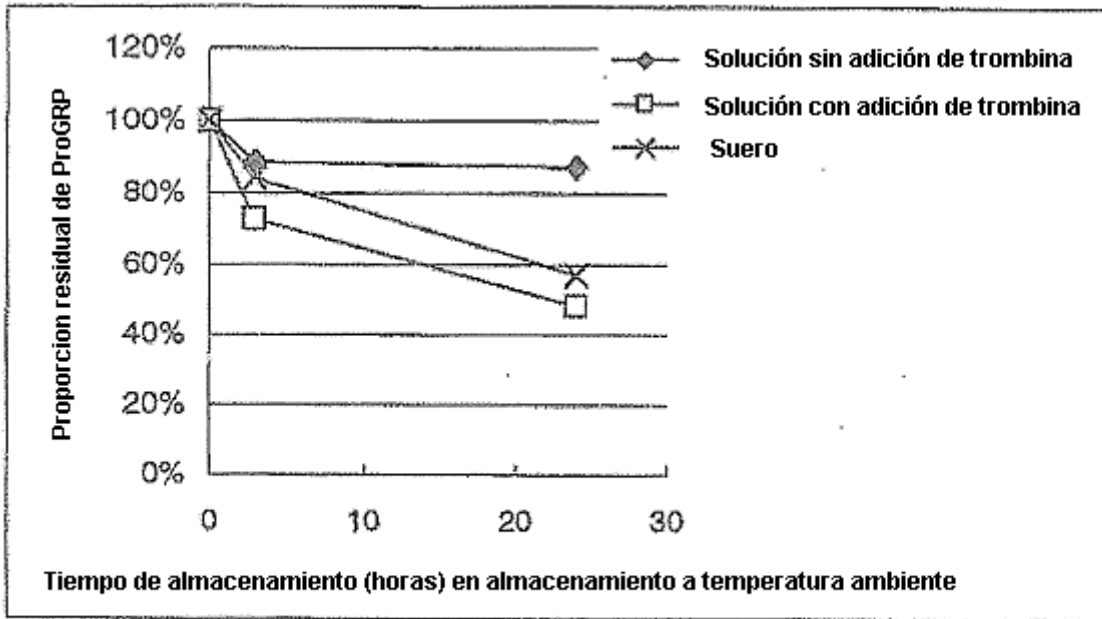


Fig.1

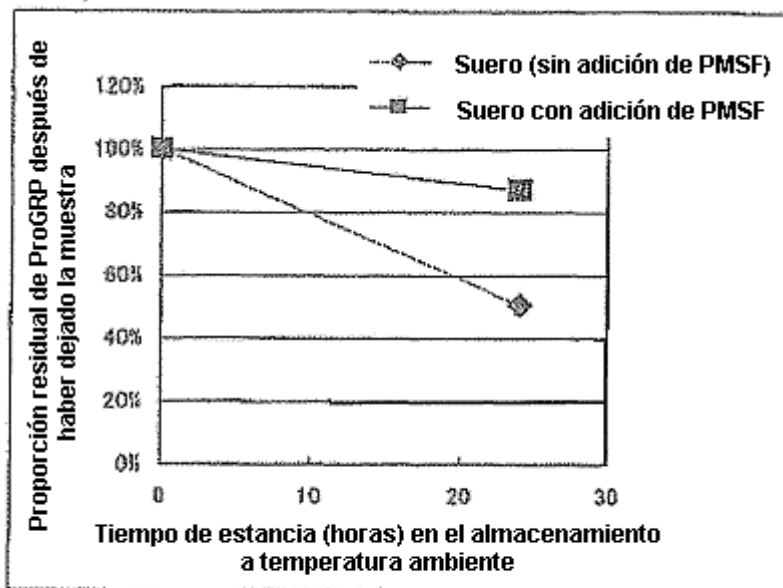


Fig.2

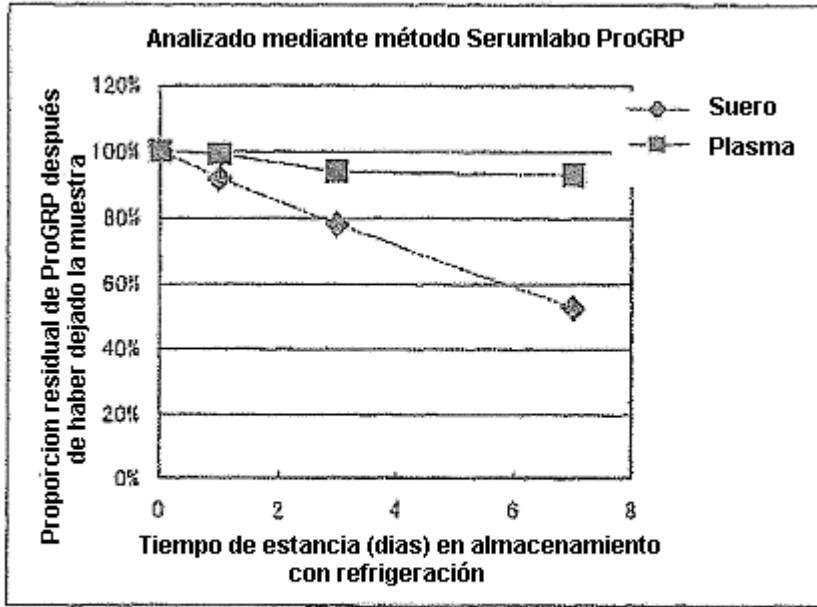


Fig.3

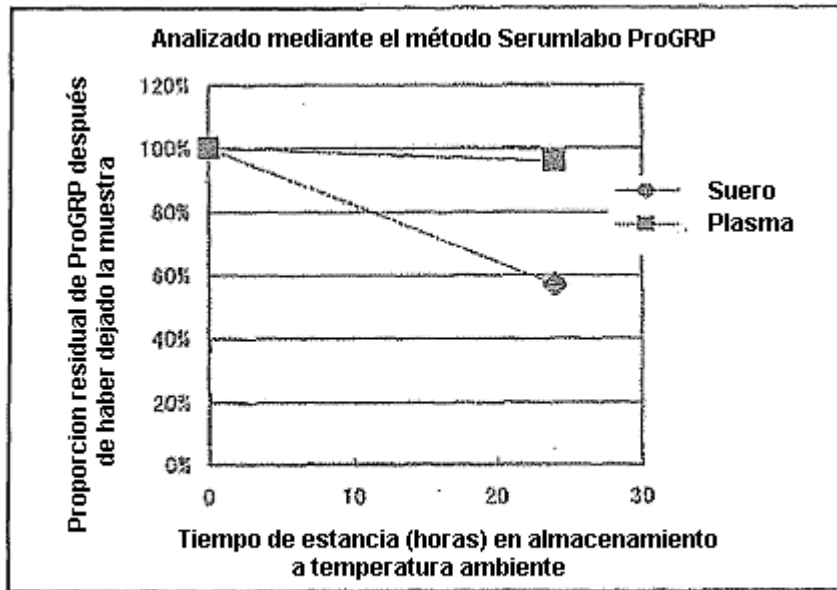


Fig.4

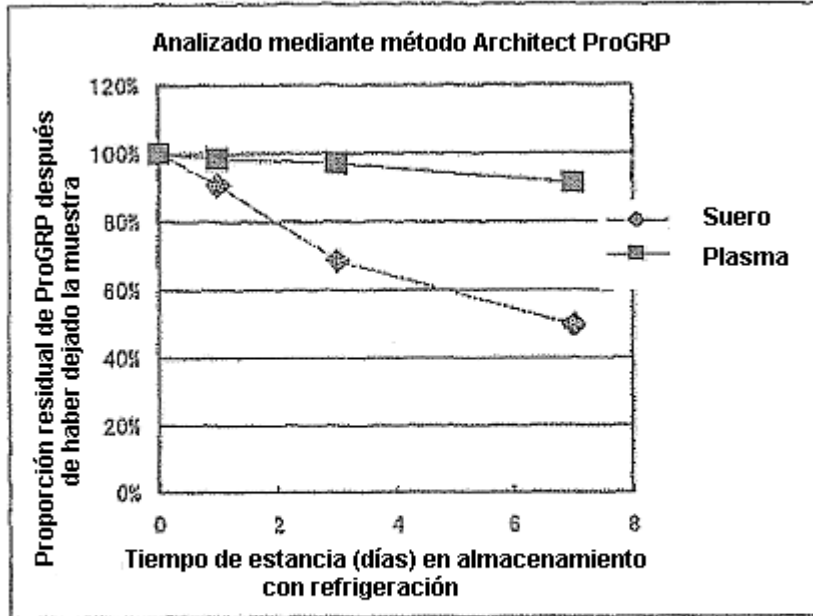


Fig.5

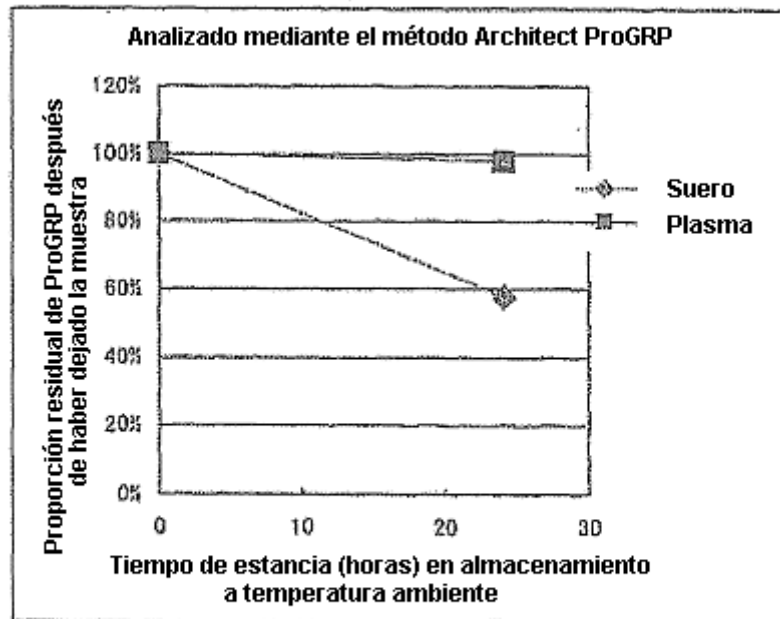


Fig.6

Fig. 7

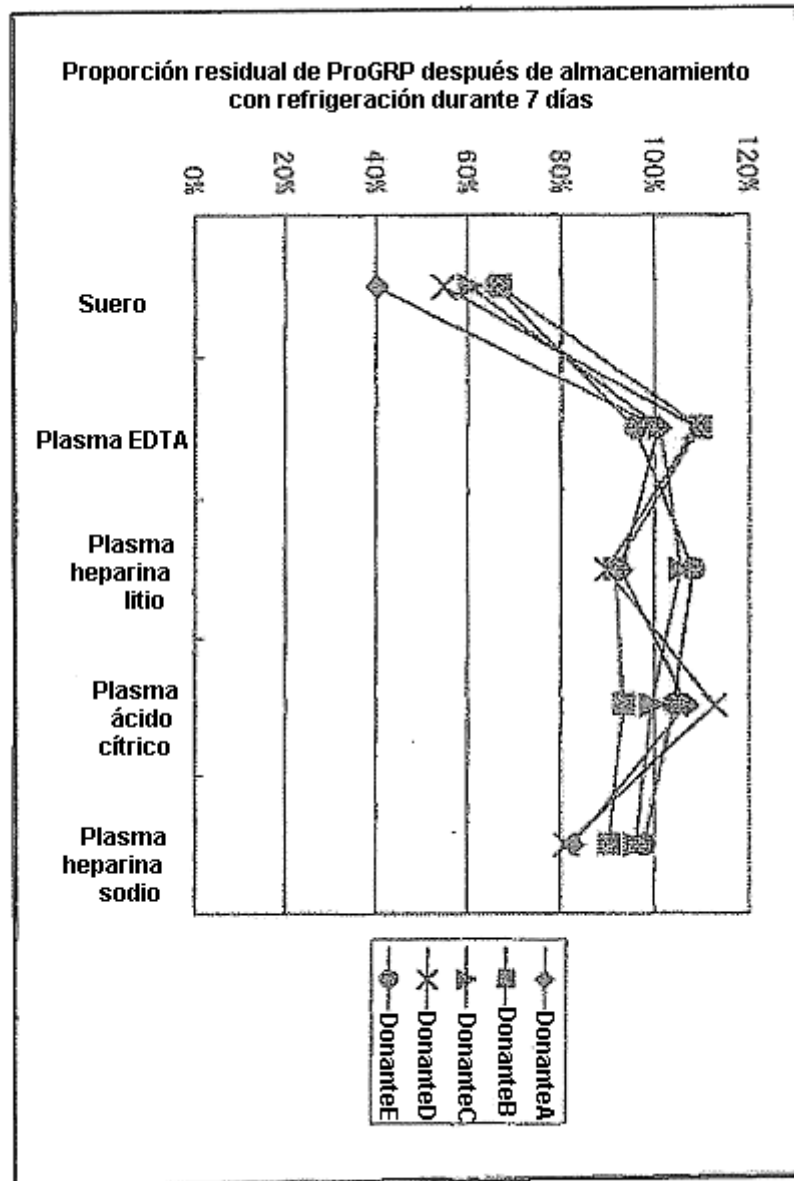
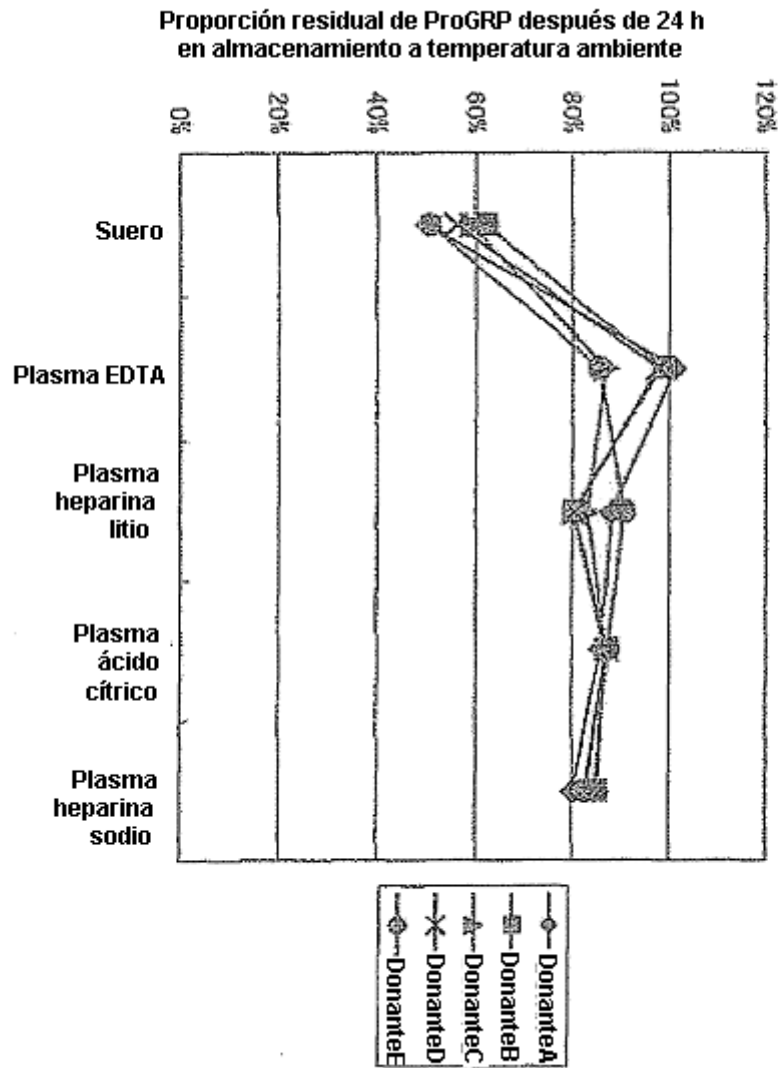


Fig. 8



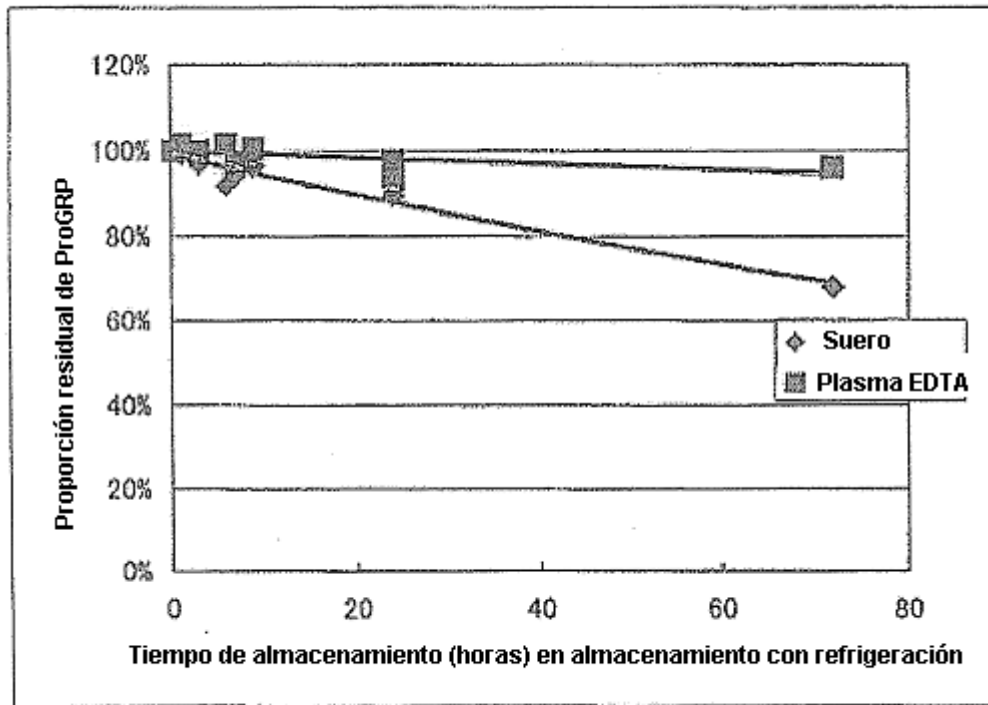


Fig.9

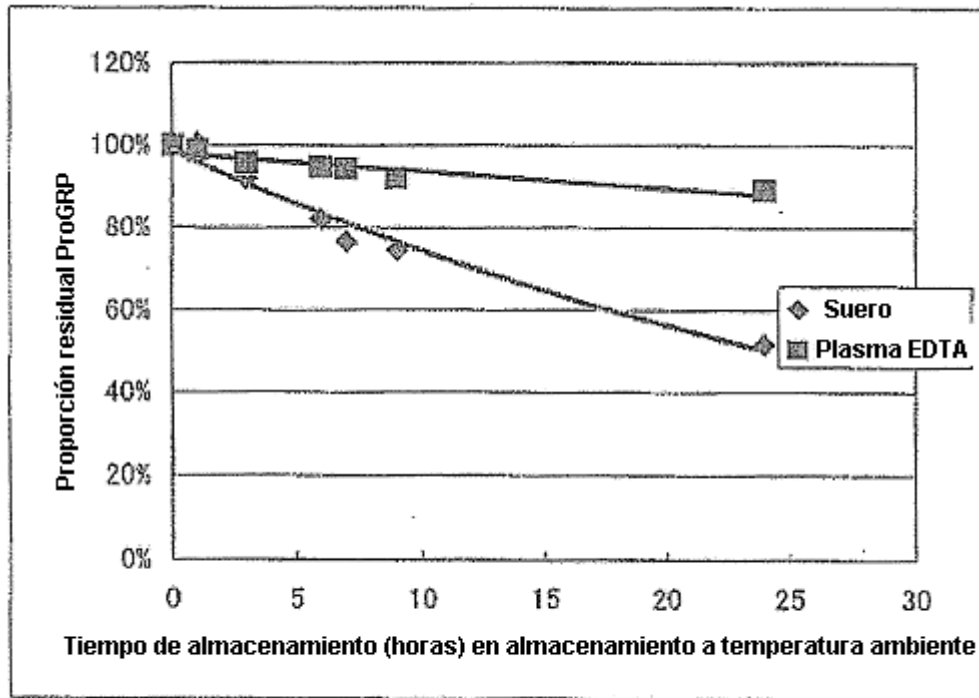


Fig.10