(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 644 283**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012** **PCT/US2012/065770**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013** **WO13078107**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012** **E 12850769 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2791351**

(54) Título: **Ensayo de fibrinógeno**

(30) Prioridad:

21.11.2011 US 201113300795

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2017

(73) Titular/es:

ETHICON, INC. (100.0%)
U.S. Route 22
Somerville, NJ 08876, US

(72) Inventor/es:

DEANGLIS, ASHLEY y
BURCOGLU, ELIF

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 644 283 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de fibrinógeno

Campo de la invención

La presente invención está relacionada, en general, con un inmunoensayo para detectar fibrinógeno en presencia de trombina.

Antecedentes

La sangre es un tejido líquido que incluye glóbulos rojos, glóbulos blancos, corpúsculos y plaquetas dispersos en una fase líquida. La fase líquida es el plasma, que incluye ácidos, lípidos, electrolitos disueltos y proteínas. Una proteína particular que está presente en la fase líquida es el fibrinógeno. Cuando se produce un sangrado, el fibrinógeno reacciona con la trombina (una enzima) para formar un coágulo de fibrina insoluble.

En muy diversas circunstancias, los animales -incluyendo los humanos- pueden padecer sangrados debidos a heridas o procedimientos quirúrgicos. En algunas circunstancias, el sangrado es relativamente pequeño y solo requiere de las funciones de coagulación habituales y de la aplicación de cuidados de primeros auxilios. Sin embargo, en otras circunstancias puede producirse un sangrado abundante. Normalmente, estas situaciones requieren un equipo y materiales especializados, así como personal con formación para administrar los auxilios adecuados.

En un intento de abordar los problemas previamente mencionados, se han desarrollado materiales para controlar los sangrados excesivos. Los hemostáticos tópicos absorbibles (TAHs, por sus siglas en inglés) se usan ampliamente en las aplicaciones quirúrgicas. Los TAHs incluyen productos basados en diversos textiles o esponjas tejidos o no tejidos, que normalmente están hechos a partir de materiales al menos parcialmente reabsorbibles, y que abarcan los polímeros naturales o sintéticos y combinaciones de estos, incluyendo copolímeros basados en lactida-glicolida como poliglactina 910, celulosa oxidada, celulosa oxidada regenerada (ORC, por sus siglas en inglés), gelatina, colágeno, quitina, quitosano, etc. Para mejorar el rendimiento hemostático, los andamios o andamiajes basados en los materiales previamente mencionados pueden combinarse con factores de coagulación derivados biológicamente, como la trombina y/o el fibrinógeno.

Diversas formulaciones hemostáticas que actualmente están en desarrollo o se encuentran disponibles en el mercado utilizan fibrinógeno liofilizado, a menudo en combinación con trombina liofilizada, de manera que dichas formulaciones hemostáticas se aplican en forma de polvos secos, pasta semilíquida, formulaciones líquidas u, opcionalmente, dispuestas en un andamiaje o estructura de apoyo como un andamiaje de tejido absorbible.

Diversas referencias previas en este campo están relacionadas con los análisis del plasma sanguíneo para detectar fibrina o fibrinógeno y con ensayos relacionados con estos, con el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mABs, por sus siglas en inglés) y con los mABs contra los productos de degradación de fibrinógenos. Estas referencias muestran ensayos en los que no hay trombinas presentes en las muestras (o solo está presente el precursor inactivo protrombina); que no se pueden aplicar a las proteínas de interés secas y liofilizadas; y que no comprenden pasos de solubilización y/o pasos de inactivación de la trombina.

Un artículo titulado 'Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes' ('Pruebas de laboratorio útiles para estudiar la trombogénesis en síndromes cardíacos agudos'), Fareed et al., Clinical Chemistry, 44(8 Pt 2):1845-53, 1998, desvela el uso de anticuerpos con el fibrinopéptido A (FpA) en técnicas ELISA y métodos de radioinmunoensayos para aplicaciones clínicas, ya que es común usar anticuerpos contra FpA como marcadores para la trombosis (coágulos sanguíneos intravasculares).

Un artículo titulado 'Fibrin detected in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation by fybrin-specific antibodies consists primarily of high molecular weight factor XIIIa-crosslinked and plasmin-modified complexes partially containing fibrinopeptide A' ('La fibrina detectada en el plasma de los pacientes con coagulación intravascular diseminada mediante anticuerpos específicos para la fibrina se compone, principalmente, de factor reticulado con XIIIa con un alto peso molecular y de complejos modificados con plasmina que contienen parcialmente fibrinopéptido A'), Pfitzner et al., Thrombosis & Haemostasis, 78(3):1069-78, 1997, desvela que se analizaron muestras de plasma de pacientes con coagulación activa usando diversos anticuerpos (incluyendo anticuerpos para el fibrinopéptido A) para determinar el fibrinógeno/fibrina en compuestos coagulantes (o complejos de coagulación). El material de partida de la muestra era plasma.

Un artículo titulado 'The conversion of fibrinogen to fibrin: recombinant fibrinogen typifies plasma fibrinogen' ('La conversión de fibrinógeno en fibrina: el fibrinógeno recombinante representa el fibrinógeno del plasma'), Gorkun et al., Blood, 89(12):4407-14, 1997, desvela que se usó HPLC para cuantificar la cantidad de FpA liberada de las dos formas de fibrinógeno. El material de partida de la muestra era líquido (plasma).

Un artículo titulado 'Isolation and characterization of the fibrin intermediate arising from cleavage of one fibrinopeptide A from fibrinogen' ('Aislamiento y caracterización del intermediario de fibrina resultante de la escisión

de un fibrinopéptido A del fibrinógeno'), Shainoff et al., Journal of Biological Chemistry, 271(39):24129-37, 1996, desvela un estudio de 'alfa-profibrina' (un monómeno de fibrina con un único fibrinopéptido A liberado, en lugar de los habituales dos péptidos de FpA liberados) y su capacidad de polimerización. Se usó un anticuerpo monoclonal que se dirigió contra el FpA para determinar si el FpA se había escindido o descompuesto. El material de partida era una solución que contenía fibrinógeno, fibrina o intermediarios.

Un artículo titulado 'A monoclonal antibody, specific for human fibrinogen, fibrinopeptide A-containing fragments and not reacting with free fibrinopeptide' ('Un anticuerpo monoclonal, específico para fibrinógeno humano, fragmentos que contienen fibrinopéptido A y que no reaccionan con fibrinopéptido libre'), Koppert et al., Blood, 66(3):503-7, 1985, describe la producción un anticuerpo monoclonal para FpA.

Un artículo titulado 'Monoclonal antibodies to different neo-epitopes on fibrinogen and fibrin degradation products' ('Anticuerpos monoclonales para diferentes neoepítopos en productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina'), Amiral et al., Blood Coagul. Fibrinolysis, Octubre de 1990; 1(4-5):447-52, desvela un intento para desarrollar diversos anticuerpos monoclonales que son específicos para los neoepítopos que se desenmascaran durante la degradación de la fibrina o el fibrinógeno y que están clasificados según tres tipos de reactividad: D y dímeros D, dímeros D y fibrinógeno precoz, y productos de la degradación de la fibrina. Estos anticuerpos monoclonales se usaron para desarrollar ensayos con transparencias de látex y técnicas ELISA. Se obtuvieron dos tipos de ensayos de plasma citratado: aquellos que eran específicos para productos relacionados con la fibrina y aquellos que analizaban el total de productos de la degradación del fibrinógeno o la fibrina.

Un artículo titulado 'A monoclonal antibody-based quantitative enzyme immunoassay for the determination of plasma fibrinogen concentrations' ('Un inmumoensayo de enzimas cuantitativo basado en anticuerpos monoclonales para determinar las concentraciones de fibrinógeno plasmático'), Hoegee-de Nobel et al., Thromb. Haemost., 22 de diciembre de 1988; 60(3):415-8, desvela inmumoensayos de enzimas cuantitativos basados en anticuerpos monoclonales para determinar las concentraciones de fibrinógeno plasmático y muestra ensayos inmunológicos para el fibrinopéptido A del fibrinógeno, que no detectan los productos de degradación del fibrinógeno.

Un artículo titulado 'Comparison of several mouse and rat monoclonal antibodies against human fibrinogen' ('Comparación de diversos anticuerpos monoclonales de ratas y ratones contra fibrinógeno humano'), Marecek et al., Hybridoma, diciembre de 1996; 15(6):423-7, desvela que se determinaron seis anticuerpos monoclonales cultivados contra fibrinógeno humano. Los anticuerpos monoclonales de ratón se marcaron contra epítopos secuenciales en el dominio D inmunodominante del fibrinógeno y mostraron reactividad cruzada con todas las moléculas que contenían el dominio D (productos de la degradación del fibrinógeno y la fibrina).

La Patente de EE UU nº 7,790,410 B2 desvela un método para seleccionar un material candidato para hemocompatibilidad, que incluye los siguientes pasos: (1) poner en contacto el material candidato con fibrinógeno; (2) poner en contacto el material candidato del paso (1) con trombina; determinar la presencia o el nivel del producto de la escisión del fibrinógeno del paso (2); y determinar si el material candidato es hemocompatible basándose en la presencia o el nivel del producto de la escisión del fibrinógeno.

La Patente de EE UU nº 6,074,837 desvela un inmumoensayo competitivo para determinar la fibrina y los productos de la degradación de la fibrina en una muestra, de manera que dicho inmunoensayo incluye poner en contacto individualmente la mencionada muestra y un control positivo -con una concentración conocida de fibrina y productos de la degradación de la fibrina- con un anticuerpo marcado que se une específicamente a la mencionada fibrina y a los mencionados productos de la degradación de la fibrina, y, tras un periodo de incubación adecuado, separar los anticuerpos marcados unidos de los anticuerpos marcados sin unir, medir los marcadores unidos, y comparar los marcadores unidos medidos de la muestra que se ha puesto en contacto y los marcadores unidos medidos del control positivo que se ha puesto en contacto a fin de determinar la presencia o la cantidad de la mencionada fibrina y los mencionados productos de la degradación de la fibrina en la mencionada muestra, de manera que las mejoras incluyen el uso de un fibrinógeno modificado como fibrina y productos de degradación de la fibrina en el mencionado control positivo. Además, la referencia desvela un inmunoensayo sándwich para determinar fibrina y productos de la degradación de la fibrina en una muestra, de manera que dicho inmumoensayo sándwich comprende revestir los pocillos de una placa microtituladora con un primer anticuerpo que se une específicamente a la mencionada fibrina, los mencionados productos de degradación de la fibrina y los monómeros de fibrina; poner en contacto la mencionada muestra y un control positivo -con una concentración conocida de fibrina o monómeros de fibrina- con pocillos separados de la mencionada placa microtituladora; extraer cualquier muestra no unida o fijada -o cualquier control positivo- de su pocillo respectivo; poner en contacto cada pocillo con un primer anticuerpo marcado; medir cualquier marcador unido en cada pocillo y comparar los marcadores unidos medidos de los pocillos de las muestras y los marcadores unidos medidos de los pocillos de los controles positivos a fin de determinar la presencia o la cantidad de la mencionada fibrina y los mencionados productos de la degradación de fibrina, de manera que las mejoras incluyen el uso de un fibrinógeno modificado como fibrina y productos de degradación de la fibrina en el mencionado control positivo, y de manera que el fibrinógeno modificado se obtiene mediante un proceso que incluye los siguientes pasos: (1) reducir parcialmente fibrinógeno de 3 a 25 micromolares -con 0,25 milimoles por nanomol del mencionado fibrinógeno- con un agente reductor a 30-40º C en condiciones no desnaturalizantes, y en ausencia

de cationes divalentes, durante entre 0,5 y 1,5 horas; después, (2) bloquear los grupos tiol de cualesquiera cisteínas libres que se hayan formado durante el paso (1) haciendo reaccionar el producto del paso (1) con un agente bloqueador que no provoca la precipitación del producto del paso (2) y, posteriormente, (3) hacer reaccionar el producto del paso (2) con una enzima de coagulación en un 'buffer' o tampón fisiológico en ausencia de cationes divalentes para liberar fibrinopéptidos A y B, y (4) poner fin a la actividad de la mencionada enzima de coagulación.

La Patente de EE UU nº 5,876,947 desvela una línea celular continua, identificada como P10 y depositada como ATCC, número de registro HB-12398, que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente con un epítopo determinado por una secuencia específica de aminoácidos y, además, desvela un anticuerpo monoespecífico, o un fragmento de este, que se une específicamente con el epítopo, presente en fibrinógeno, fibrinopéptido B o des-Arg fibrinopéptido B.

La Patente de EE UU nº 4,438,209 desvela un método de radioinmunoensayo competitivo para deteminar la concentración de fibrinopéptido A en plasma, de manera que, primero, se recoge una muestra de sangre y se inhibe la trombina presente en dicha muestra de sangre mediante una cantidad inhibidora de un inhibidor de trombina y el plasma se separa de la mencionada muestra; y, segundo, una muestra del mencionado plasma se pone en contacto -en condiciones de unión de un inmunoensayo competitivo- con una cantidad suficiente de un anticuerpo para fibrinopéptido A y fibrinopéptido A marcado radiactivamente; después, el fibrinopéptido A unido a los anticuerpos se separa del fibrinopéptido A no unido y se mide la radiactividad, de manera que la mejora consiste en utilizar como inhibidor para la trombina un inhibidor seleccionado de un grupo que se compone de D-fenilalanil-L-propil-L-N-[2(1-cloro-7-guanidoheptano-2-ona)], la sal de adición de ácido hidroclórico de este compuesto, la sal de adición de ácido hidrofluórico de este compuesto, la sal de adición de ácido acético de este compuesto y la sal de adición de ácido cítrico de este compuesto.

La Publicación de Patente Europea EP 345,811 A2 desvela un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal que es específico para el fibrinopéptido A humano, pero que no reacciona con fibrinógeno intacto o con fragmentos de fibrinógeno que contienen fibrinopéptido A humano. Además, la referencia desvela un método para determinar FpA libre que comprende (a) inmovilizar un anticuerpo monoclonal -este anticuerpo monoclonal tiene unas características de acuerdo con la reivindicación 1-, (b) poner en contacto el anticuerpo monoclonal inmovilizado de (a) con un péptido hFPA marcado o un fragmento marcado de este o un derivado Tyr de este, y una muestra de plasma, y (c) analizar los marcadores.

La Patente de EE UU nº 5,817,768 desvela un anticuerpo monoespecífico, que se une a un epítopo de la subunidad αE de fibrinógeno, de manera que dicho anticuerpo monoespecífico es producido por una línea celular (hibridoma) seleccionada de un grupo que se compone del hibridoma identificado como #3-10, el hibridoma identificado como #29-1 y el hibridoma identificado como #148-B.

La Publicación de Patente de PCT WO2007/030571 A2 desvela la identificación de moléculas diana que provocan enfermedades y el desarrollo de agentes reactivos de imagen y ensayos diagnósticos específicos para estas moléculas. En el documento se describen métodos y reactivos para la identificación de objetivos moleculares que son específicos de una enfermedad, métodos de tecnologías de imágenes que pueden usarse, el desarrollo de reactivos de imagen moleculares específicos, la validación clínica de los reactivos de imagen y las indicaciones clínicas para las imágenes moleculares. La referencia reivindica un reactivo de imagen específico para objetivos, que comprende un agente de afinidad unido a un reactivo de imagen, de manera que dicho agente de afinidad se une específicamente a una molécula biológica, y de manera que la expresión de dicha molécula biológica predice una enfermedad.

La Publicación de Patente de PCT WO2007/030531 describe la identificación de moléculas diana que provocan enfermedades y el desarrollo de agentes reactivos de imagen y ensayos diagnósticos específicos para estas moléculas. En el documento se describen métodos y reactivos para la identificación de objetivos moleculares que son específicos de una enfermedad, métodos de tecnologías de imágenes que pueden usarse, el desarrollo de reactivos de imagen moleculares específicos, la validación clínica de los reactivos de imagen y las indicaciones clínicas para las imágenes moleculares. La referencia reivindica un reactivo de imagen específico para objetivos, que comprende un anticuerpo unido a un reactivo de imagen que se puede detectar mediante resonancia magnética, de manera que dicho anticuerpo se une específicamente al Glipicano-3, y de manera que la expresión del Glipicano-3 puede servir para predecir el cáncer de hígado.

La Publicación de Solicitud de Patente nº 20110053193 desvela un método para determinar la actividad o funcionalidad de un primer componente reactivo o un segundo componente reactivo en una mezcla sin reaccionar del primer componente reactivo y el segundo componente reactivo, que comprende los siguientes pasos: (a) inhibir de manera reversible el primer componente reactivo para obtener una mezcla que tiene un primer componente reactivo inactivado y el segundo componente reactivo; (b) añadir a la mezcla una cantidad conocida del segundo componente reactivo al evaluar la actividad del primer componente reactivo, o una cantidad conocida del primer componente reactivo al evaluar la actividad del segundo componente reactivo; (c) activar de manera reversible el primer componente reactivo; (d) permitir que el primer componente reactivo reaccione con el segundo componente reactivo presente originalmente en la mezcla y con la cantidad conocida del segundo componente reactivo, o permitir

que el primer componente reactivo reaccione con el segundo componente reactivo presente originalmente en la mezcla y con la cantidad conocida del primer componente reactivo; y (e) determinar la actividad o funcionalidad del primer componente reactivo o el segundo componente reactivo presentes originalmente en la mezcla.

US 2002/0132370 está relacionado con un método para detectar en una muestra de fluido corporal al menos un marcador de la actividad de coagulación sanguínea que refleja la actividad de coagulación sanguínea de un individuo.

EP0070478 está relacionado con métodos de radioinmunoensayos para determinar la concentración de fibrinopéptido A en el plasma.

Los parches hemostáticos que contienen trombina y fibrinógeno liofilizados, opcionalmente en andamiajes o estructuras absorbibles, carecen de un ensayo para cuantificar el estado de activación de los componentes biológicos (esto es, si el fibrinógeno se han convertido en fibrina). Puesto que el fibrinógeno y la trombina reaccionan espontáneamente con la hidratación, la exposición del parche hemostático a la humedad podría provocar una activación prematura (previa a la aplicación en el sitio de sangrado) de los componentes biológicos y, potencialmente, podría afectar a la estabilidad y el rendimiento generales del parche. Actualmente, los dispositivos de liberación selladores de fibrina, que administran una mezcla de soluciones de fibrinógeno y trombina en una herida para aplicaciones hemostáticas o de sellado de tejidos, carecen de una prueba que pueda analizar directamente la conversión de fibrinógeno en fibrina. Un objetivo del trabajo de los solicitantes era desarrollar un ensayo sólido que sirviera para medir el ritmo y el alcance de la reacción de la conversión de fibrinógeno en fibrina, y también para medir la cantidad de fibrinógeno intacto en presencia de trombina.

Resumen de la invención

En pocas palabras, la presente invención está dirigida a un método para detectar el fibrinógeno intacto, que comprende los siguientes pasos: proporcionar una muestra que contiene al menos algo de fibrinógeno al menos parcialmente convertido en fibrina, y que opcionalmente contiene trombina; solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante e inhibir la actividad de trombina; tras realizar opcionalmente un SDS-PAGE, transferir una parte de la mencionada muestra a una membrana de unión de proteínas; hacer reaccionar el fibrinógeno con un anticuerpo monoclonal primario capaz de unirse a una fracción de fibrinopéptido A; y detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de anticuerpos monoclonales primarios unidos.

En una realización, la presente invención está orientada a un método para detectar fibrinógeno intacto en una muestra que contiene al menos algo de fibrinógeno, de manera que comprende los siguientes pasos: solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante que inhibe la actividad de trombina; transferir una parte de la mencionada muestra a un gel y someter dicha parte a electroforesis; transferir una porción de la mencionada parte de la muestra del mencionado gel a una membrana de unión de proteínas e inmovilizar el fibrinógeno en dicha membrana; someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de bloqueo; hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A para formar un compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos; someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo monoclonal primario sin unir; hacer reaccionar el mencionado anticuerpo monoclonal que ha formado el compuesto complejo fibrinógeno-anticuerpos con un anticuerpo secundario que tiene un marcador; someter la mencionada membrana a al menos una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo secundario sin unir que tenga un marcador; y detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad del marcador presente.

En una realización alternativa, el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana reacciona con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a fracciones de fibrinopéptido B para formar compuestos complejos de fibrinógeno-anticuerpos.

La muestra puede contener una cantidad desconocida de fibrinógeno intacto. La muestra puede ser sólida, líquida o semilíquida. La muestra puede contener fibrinógeno y trombina liofilizados.

El método puede utilizar SDS-PAGE y/o 'Western blot' o 'Dot blot'. El anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A puede ser un clon 1F7. En una realización alternativa, el anticuerpo monoclonal primario puede unirse a una fracción de fibrinopéptido B. Los fibrinopéptidos A y B se escinden o descomponen por la acción enzimática de la trombina de los terminales amino de las cadenas Aα y Bβ de fibrinógeno, respectivamente. Estos péptidos se componen de 16 y 14 aminoácidos, que tienen pesos moleculares de 1536,6 Da y 1570,6 Da, respectivamente. El anticuerpo secundario que tiene un marcador es IgG antirratón de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina.

El paso o etapa para detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de marcador puede realizarse incubando la membrana de unión de proteínas con un sustrato para fosfatasa alcalina.

El marcador puede ser un marcador detectable electroquímicamente, un marcador detectable colorimétricamente, un marcador detectable radiológicamente, un marcador detectable magnéticamente o un marcador fluorescente.

En otra realización, la presente invención está orientada a un método para evaluar el rendimiento o la estabilidad de un dispositivo hemostático que contiene al menos un componente biológico que es fibrinógeno, y que incluye comparar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en una muestra que se ha obtenido de acuerdo con el método previamente descrito en relación con el nivel de umbral de fibrinógeno intacto.

En otra realización, la presente invención está orientada a un método para detectar fibrinógeno intacto en una muestra que contiene al menos algo de fibrinógeno, de manera que comprende los siguientes pasos: solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante que inhibe la actividad de trombina; aplicar una parte de la mencionada muestra a una membrana de unión de proteínas e inmovilizar el fibrinógeno en dicha membrana; someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de bloqueo y extraer o eliminar el fibrinopéptido A escindido del fibrinógeno de la membrana del ensayo de 'Dot blot'; hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A para formar un compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos; someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo monoclonal primario sin unir; hacer reaccionar el mencionado anticuerpo monoclonal que ha formado el compuesto complejo fibrinógeno-anticuerpos con un anticuerpo secundario que tiene un marcador; someter la mencionada membrana a al menos una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo secundario sin unir que tenga un marcador; y detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad del marcador presente.

En otra realización, la presente invención está orientada a un método para detectar fibrinógeno intacto en una muestra que contiene al menos algo de fibrinógeno, de manera que comprende los siguientes pasos: solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante que inhibe la actividad de trombina; transferir una parte de la mencionada muestra a una membrana de unión de proteínas e inmovilizar el fibrinógeno en dicha membrana; someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de bloqueo y extraer o eliminar el fibrinopéptido A escindido del fibrinógeno de la membrana del ensayo de 'Dot blot' ; hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A para formar un compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos; y detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de anticuerpo monoclonal primario que forma el compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra esquemáticamente la estructura de fibrinógeno.

La Figura 2 muestra esquemáticamente la conversión o transformación del fibrinógeno en fibrina.

La Figura 3 muestra una imagen de la membrana de nitrocelulosa tras realizar el ensayo de 'Western blot'.

La Figura 4 muestra una imagen del gel teñido con azul de Coomassie inmediatamente después de la transferencia de proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa.

La Figura 5 muestra una imagen de la membrana de nitrocelulosa tras realizar el ensayo de 'Dot blot'.

La Figura 6 muestra una gráfica que indica una relación lineal entre las concentraciones de fibrinógeno y la intensidad de la tinción.

La Figura 7 muestra un diagrama de bloques del método de la invención en relación con el ensayo de 'Western blot'.

La Figura 8 muestra un diagrama de bloques del método de la invención en relación con el ensayo de 'Dot blot'.

Descripción detallada de la invención

El fibrinógeno es la proteína precursora de la matriz de coágulos sanguíneos. Tiene un peso molecular de 340 000 Da y se compone de 3 pares de cadenas de polipéptidos no idénticas (Aα, Bβ y γ) unidas mediante enlaces disulfuros. El fibrinógeno tiene una estructura trinodular: dos dominios globulares D terminales idénticos y un dominio globular central E. Todos estos dominios están conectados mediante hélices α superenrolladas, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura 1, de manera que las designaciones FpA y FpB se corresponden con los fibrinopéptidos A y B, respectivamente.

En circunstancias normales, la sangre está contenida en una red continua de conductos alineados mediante

celulas endoteliales. La superficie luminal de las células endoteliales forma una barrera 'hemocompatible' que inhibe la coagulación espontánea de la sangre y la adhesión de las plaquetas. Sin embargo, cuando el revestimiento endotelial se interrumpe, se ponen en marcha una serie de reacciones bioquímicas para detener la pérdida de sangre. Inmediatamente después de la lesión vascular, el vaso lesionado se constriñe o aprieta para que la sangre se desvíe del lugar de la lesión. El proceso de coagulación se inicia mediante la unión de proteínas y plaquetas específicas del plasma con las estructuras subendoteliales recién expuestas como resultado de la interrupción del revestimiento endotelial. Las células endoteliales dañadas también inician el proceso de coagulación liberando factor tisular, un compuesto complejo de proteínas y fosfolípidos. Una vez que la coagulación ha comenzado, tiene lugar una 'cascada' de activaciones enzimáticas, lo que da lugar a la formación de un coágulo de sangre rico en plaquetas o de un 'tapón' hemostático en el sitio de la lesión.

Se hace una referencia a la siguiente publicación, AP DeAnglis y GS Retzinger, 'Fibrin(ogen) and Inflammation: Current Understanding and New Perspectives' ('Fibrina -fibrinógeno- e inflamación: conocimientos actuales y nuevas perspectivas'), Clinical Immunology Newsletter (1999); 18, 111-118.

Un paso o etapa crítica en la formación de un coágulo de sangre es la conversión o transformación -catalizada mediante trombina- de fibrinógeno en fibrina. Para que suceda esta conversión, la propia trombina debe transformarse desde su precursor inactivo, protrombina, por medio de un complejo de enzimas generado durante el proceso de coagulación. La trombina, una serina proteasa, hidroliza enlaces específicos de arginina-glicina situados en los términos amino de las cadenas de polipéptidos Aα y Bß de fibrinógeno, liberando de la proteína dos pares de fragmentos de proteínas que están cargados negativamente y se denominan fibrinopéptidos A y B. Estos péptidos solo constituyen el 2% de la masa total del fibrinógeno. La liberación de los fibrinopéptidos cambia la carga en el dominio E de negativa a positiva, facilitando las interacciones de este dominio con los dominios D -cargados negativamente- de otras moléculas de fibrina. Las interacciones de unos monómeros de fibrina con otros dan como resultado el ensamblaje o unión espontánea de los monómeros de fibrina en una configuración medio escalonada, como se muestra esquemáticamente en la Figura 2. La asociación específica de los monómeros de fibrina que ocurre durante la polimerización de la fibrina es el resultado de las interacciones no covalentes entre sitios de polimerización complementarios, denominados nudos y agujeros, en los dominios E y D de los monómeros de fibrina. Al principio, el ensamblaje o estructura de polímeros de fibrina produce una protofibrilla, un largo oligómero de fibrina que tiene el grosor de dos moléculas. Con el tiempo, las protofibrillas se asocian lateralmente para formar grupos de protofibrillas, que posteriormente se juntan en fibras más grandes de fibrina. El proceso de ensamblaje de las protofibrillas provoca la formación de una red interconectada de fibras de fibrina, con la forma característica en una disposición medio escalonada.

La conversión de fibrinógeno en fibrina es un paso o etapa crucial en el proceso de hemostasis, que incluye la descomposición -catalizada por la trombina- de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, lo que provoca la formación de monómeros de fibrina, que posteriormente se juntan en polímeros de fibrina. Medir el alcance de la conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de la trombina supone un reto, puesto que, en condiciones normales, la enzima hidroliza espontáneamente el fibrinógeno en fibrina. La cantidad de fibrinógeno sólo puede medirse si la proteína está solubilizada. Si las proteínas están lo suficientemente solubilizadas, la trombina transformará espontáneamente el fibrinógeno en fibrina, impidiendo la medición del fibrinógeno original.

Objetivos

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método que puede medir la cantidad de conversión de fibrinógeno en fibrina en un material de partida que se compone de fibrinógeno y/o fibrina secos, denominados a partir de ahora 'fibrinógeno/fibrina', y polvos de trombina.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método que permite medir la potencial conversión prematura de fibrinógeno en fibrina de un material de partida que se compone de fibrinógeno/fibrina secos y polvos de trombina. La formación espontánea de fibrina se evita inhibiendo la trombina durante la solubilización.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método que puede usarse para evaluar el ritmo y el alcance de la reacción entre el fibrinógeno y la trombina en las formulaciones líquidas que contienen ambas proteínas.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método que puede usarse para evaluar la reacción bioquímica entre el fibrinógeno y la trombina para optimizar las formulaciones líquidas o la eficacia de mezclado (aplicable a las formulaciones líquidas de sellado de fibrina y a las puntas de mezclado especializadas).

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método que utiliza la solubilización de las proteínas para medir la cantidad de fibrinógeno y fibrina. Para evitar la formación espontánea de fibrina durante la preparación de la muestra, se usan condiciones optimizadas que inactivan inmediatamente la trombina con la hidratación, solubilizando las proteínas. El procedimiento de preparación de muestras debe evitar/minimizar cualquier generación de fibrina, de manera que se pueda determinar la cantidad de fibrinógeno en la muestra

original.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método que pueda tener aplicaciones clínicas y diagnósticas para identificar la presencia de fibrinógeno y diferenciar entre fibrinógeno y fibrina cuando las dos proteínas están presentes a la vez. La sedimentación de fibrinógeno y fibrina es un marcador importante para muchos estados patológicos, por ejemplo, inflamación, arteroesclerosis, tumores, tromboembolias, etc. La presencia y/o las cantidades relativas de fibrinógeno y fibrina pueden usarse como indicadores de diagnóstico y pronóstico.

Resumen del método

De acuerdo con una realización de la presente invención, el fibrinógeno y la trombina liofilizados se solubilizan antes de o como parte del ensayo de fibrinógeno intacto de la invención. Para evitar la transformación de fibrinógeno en fibrina durante la solubilización, la trombina debe inactivarse inmediatamente con la hidratación. Para medir la cantidad de fibrinógeno, la mezcla de proteínas puede separarse mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y colocarse en una membrana de unión de proteínas (por ejemplo, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno). De manera alternativa, la mezcla de proteínas puede aplicarse directamente en la membrana. Usando un anticuerpo dirigido contra FpA o FpB, el fibrinógeno intacto puede detectarse en la membrana; sin embargo, si el fibrinógeno intacto original se ha convertido en fibrina (mediante la escisión del fibrinopéptido del fibrinógeno), no se detectará ninguna proteína en la membrana. Este método inventivo puede evaluar la conversión de fibrinógeno en fibrina y se puede aplicar a cualquier mezcla de fibrinógeno/fibrina y trombina.

Adicionalmente, el paso o etapa de solubilización, necesario para la medición del fibrinógeno, puede provocar una reacción espontánea entre el fibrinógeno y la trombina e impedir así una medición precisa de cualquier reacción anterior a la solubilización de la muestra. Los inventores descubrieron que unas condiciones de solubilización específicas inhiben la actividad de trombina a la vez que se siguen solubilizando las proteínas. Las condiciones/reactivos de solubilización de la invención incluyen un inhibidor de trombina, una alta concentración de detergente y un agente reductor en combinación con una temperatura elevada.

El método analítico para medir la conversión de fibrinógeno en fibrina que se describe en la presente invención es una técnica de inmunotransferencia ('immunoblotting', en inglés) que utiliza un anticuerpo específico para la parte de la molécula de fibrinógeno que se hidroliza y escinde por medio de la enzima trombina. Usando este anticuerpo, se detecta una muestra que contenga fibrinógeno, mientras que una muestra completamente reaccionada que solo contenga fibrina no será detectada por este anticuerpo. Una muestra que está parcialmente reaccionada provocará una respuesta intermedia que puede cuantificarse usando la técnica de inmunotransferencia.

De acuerdo con una realización de la presente invención, un método para detectar fibrinógeno (intacto) incluye el paso de solubilización y el paso de inmunotransferencia.

El paso de solubilización incluye solubilizar la muestra a la vez que se inhibe la actividad de trombina.

El paso de inmunotransferencia incluye lo siguiente: la transferencia o aplicación de muestras a una membrana; SDS-PAGE opcional; el paso de bloqueo; hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en una membrana con un anticuerpo primario monoclonal; el paso de lavado para retirar los anticuerpos primarios sin reaccionar; hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal con un anticuerpo secundario que tiene un marcador; el paso de lavado para retirar o eliminar los anticuerpos secundarios sin reaccionar; y detectar la cantidad de fibrinógeno intacto cuantificando la cantidad del marcador.

Parche hemostático que contiene fibrinógeno y trombina liofilizados

En el presente documento se hace referencia a un parche hemostático -que contiene fibrinógeno y trombina liofilizada en andamiajes absorbibles y que se utilizó en las pruebas experimentales de la presente invención- como 'parche que contiene fibrinógeno'. El parche que contiene fibrinógeno se compone de una estructura compuesta que comprende capas de Vicryl® (Poliglactina 910) y ORC (celulosa regenerada oxidada). La capa de Vicryl® está revestida con fibrinógeno humano y polvos de trombina en estado seco, sin reaccionar. Cuando el producto se aplica al sitio de sangrado, las proteínas se hidratan, lo que provoca la conversión del fibrinógeno en fibrina y la formación de un coágulo de fibrina. La formación de fibrina en la superficie tisular favorece la hemostasis y la adhesión al tejido. Es vital que las proteínas permanezcan en un estado sin reaccionar antes de su aplicación al tejido. La conversión prematura de fibrinógeno en fibrina (activación previa al uso del producto) debido a la exposición al agua durante la producción o el almacenamiento podría tener un impacto negativo sobre el rendimiento y la estabilidad.

La Patente de EE UU 7,666,803, de Shetty et al., titulada 'Reinforced absorbable multilayered fabric for use in medical devices' ('Tejido reforzado, absorbible y con múltiples capas para usarse en dispositivos médicos') se incorpora en su totalidad mediante referencia en el presente texto y está relacionada con un tejido multicapa que comprende un primer tejido no tejido absorbible y un segundo tejido tejido absorbible que comprende polisacáridos oxidados.

La Solicitud de Patente de EE UU publicada 2006/0088589 A1, titulada 'Method for making an absorbable hemostat' ('Método para hacer un hemostato absorbible'), de Gorman et al., se incorpora en su totalidad mediante referencia en el presente texto y desvela un método para preparar un apósito para heridas, que se caracteriza por el hecho de que comprende: suspender el polvo de trombina y/o fibrinógeno en un fluido portador de hidrocarburo perfluorado en el cual no son solubles, y aplicar la suspensión resultante a un primer tejido no tejido absorbible.

La Solicitud de Patente de EE UU publicada 2009/0246238A1, de Gorman et al., titulada 'Reinforced absorbable multilayered hemostatic wound dressing' ('Apósito reforzado para heridas, hemostático, multicapa y absorbible') se incorpora en su totalidad mediante referencia en el presente texto y trata sobre un método para preparar un apósito para heridas multicapa que tiene un primer tejido no tejido absorbible, un -o uno o más- segundo tejido tejido absorbible, trombina y/o fibrinógeno, de manera que el método comprende los siguientes pasos: (a) 'crimpar' o engarzar las fibras o hilos de polímeros absorbibles en un rango de entre alrededor de 10 y 30 'crimpados' por pulgada; (b) cortar las fibras o hilos crimpados a una longitud básica de entre alrededor de 0,1 y 2,5 pulgadas (1 pulgada=2,54 cm); (c) cardar la fibra para formar el primer tejido no tejido absorbible mientras se controla la humedad a alrededor de un 20-60% y a una temperatura ambiente de entre 15 y 24º C; (d) unir el primer tejido no tejido absorbible al segundo tejido tejido absorbible; (e) aplicar trombina y/o fibrinógeno al primer tejido no tejido absorbible.

Los parches que contienen fibrinógeno -realizados como se ha explicado previamente- se utilizaron en los experimentos que se llevaron a cabo para poner en práctica la presente invención. La matriz multicapa del parche que contiene fibrinógeno se compone de una capa de respaldo tejida de ORC que está unida a una capa de fibras no tejidas de Poliglactina 910 (PG910). Durante el proceso de fabricación, las fibras de PG910 se cardan en un relleno y se 'punzonan' en la capa de respaldo de ORC para producir la matriz multicapa.

Preferiblemente, los componentes biológicos del parche que contiene fibrinógeno son formas liofilizadas de fibrinógeno humano y trombina humana. Contienen, respectivamente, los ingredientes biológicamente activos, fibrinógeno y trombina, y otros excipientes. Las composiciones de fibrinógeno humano y trombina humana que se aplican al parche que contiene fibrinógeno son fibrinógeno de 2-20 mg/cm2 y trombina de 1-150 IU/cm2.

Además de medir el nivel de conversión de fibrinógeno en fibrina en una mezcla de fibrinógeno y trombina secos, el presente método puede usarse para medir el alcance de la conversión de fibrinógeno en fibrina en una formulación líquida que contiene fibrinógeno y trombina. Los ejemplos de estas formulaciones son los selladores de fibrina disponibles comercialmente, que están compuestos de soluciones concentradas de fibrinógeno y trombina que se aplican de forma simultánea, pero por separado, a un sitio de sangrado para controlar la hemorragia. Cuando las dos soluciones de proteínas están bien mezcladas, el fibrinógeno se convierte rápidamente en fibrina. Medir el ritmo y el alcance de la formación de fibrina supone un reto debido a la rapidez de la formación de fibrina y la insolubilidad del coágulo de fibrina resultante. Pueden usarse diversos enfoques para evaluar el grado de mezclado de los líquidos; sin embargo, estos enfoques no evalúan bioquímicamente la transformación del fibrinógeno en fibrina. Usando las técnicas de inmunotransferencia aquí descritas, pueden determinarse las cantidades relativas de fibrinógeno y fibrina presentes en la mezcla de un sellador de fibrina.

El sellador de fibrina (humano) EVICEL®, disponible de la mano de Johnson & Johnson Wound Management, Sommerville, New Jersey, EE UU, se suministra como un kit que contiene BAC2 (fibrinógeno de 55-85 mg/mL) y trombina (trombina humana de 800-1200 IU/mL). BAC2 es una solución esterilizada, con un pH de entre 6.7 y 7.2, que se compone principalmente de un concentrado de fibrinógeno humano. La composición del BAC2 es la siguiente: concentrado de fibrinógeno humano (55-85 mg/mL); hidrocloruro de arginina, glicina, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio y agua para inyección. La trombina es una solución esterilizada, con un pH de entre 6.8 y 7.2, que contiene trombina humana purificada. La composición de la solución de trombina es la siguiente: trombina humana (800-1200 IU/mL); cloruro de calcio, albúmina humana, manitol, acetato de sodio y agua para inyección.

El presente método de invención puede tener otras aplicaciones clínicas y diagnósticas para diferenciar entre el fibrinógeno y la fibrina cuando ambas proteínas están juntas, o para medir las cantidades relativas de fibrinógeno y fibrina presentes en una muestra. En resumen, el método puede evaluar o analizar la conversión de fibrinógeno en fibrina, y puede aplicarse a cualquier mezcla de fibrinógeno/fibrina y trombina.

Paso de solubilización

En una realización de la presente invención, se solubilizan las muestras que contienen trombina y fibrinógeno/fibrina en formulaciones secas y/o líquidas.

El reactivo de solubilización de la invención contiene una alta concentración de detergente y agente reductor (4% de sodio dodecil sulfato (SDS) y 500 mM de ditiotreitol (DTT)), y un inhibidor directo de la trombina (por ejemplo, 200 mg/mL de Pefabloc® SC) junto con una temperatura elevada (95º C). Como resultado de ello, la trombina se inactiva y no puede catalizar la generación de fibrina. De este modo, la trombina y el fibrinógeno pueden existir sin interactuar en forma solubilizada en la misma solución.

Una vez solubilizadas, las proteínas se evalúan mediante técnicas de electroforesis e inmunotransferencia.

Paso de inmunotransferencia

Para evaluar el alcance de la conversión de fibrinógeno en fibrina, diversas muestras se sometieron opcionalmente a un SDS-PAGE, seguido de un análisis de 'Western blot' o 'Dot blot'. Para la detección se utilizó un anticuerpo monoclonal [clon 1F7], específico para el fibrinopéptido A de fibrinógeno.

Anticuerpo monoclonal [clon 1F7] dirigido contra fibrinopéptido A

De acuerdo con una realización de la presente invención, el ensayo de la invención utiliza un anticuerpo monoclonal [clon 1F7] dirigido contra el fibrinopéptido A (FpA) presente en la molécula de fibrinógeno intacto (sin reaccionar).

El anticuerpo monoclonal se adquirió a través de Abcam Inc. (Cambridge, Massachusetts, EE UU) y se caracterizó mediante electroforesis y ELISA.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la presencia de FpA se usa como indicador para detectar fibrinógeno intacto. Debido a la ausencia de FpA, este anticuerpo no detectará el fibrinógeno completamente convertido en fibrina.

En una muestra que contiene una mezcla de fibrina y fibrinógeno inmovilizado(s), el anticuerpo sólo se unirá al fibrinógeno intacto inmovilizado.

Artículos de prueba utilizados en el ensayo de la invención

La descripción de más adelante detalla la composición y preparación de los artículos de prueba o muestras que se utilizaron en los ejemplos experimentales para demostrar el funcionamiento del ensayo de la invención. Los artículos de prueba o muestras específicos se enumeran en las Tablas 1 y 2 de más adelante.

Para evaluar el alcance de la conversión de fibrinógeno en fibrina, diversas muestras que contenían la proteína, desde fibrinógeno intacto hasta fibrina (producto de reacción), así como muestras de control, se analizaron por medio de técnicas de detección de 'Western blot' y 'Dot blot' directas. Para la detección se usó un anticuerpo monoclonal específico para fibrinopéptido A de fibrinógeno.

El material de partida utilizado para preparar los artículos de prueba incluía fibrinógeno purificado disponible comercialmente, trombina altamente concentrada y componentes de fibrinógeno de un sellador de fibrina disponible comercialmente, y también incluía un parche que contiene fibrinógeno, fabricado por Ethicon Inc., tal y como se ha descrito previamente.

Las muestras sin reaccionar incluían fibrinógeno purificado, el componente de fibrinógeno del sellador de fibrina, y polvos biológicos extraídos de un parche que contiene fibrinógeno seco. Las muestras reaccionadas completamente incluían sellador de fibrina de coagulación líquido y polvos extraídos de un parche que contiene fibrinógeno que estaba completamente hidratado para formar coágulos. Una muestra parcialmente reaccionada incluía polvos extraídos de un parche que contiene fibrinógeno y expuesto(s) a un volumen limitado de medio acuoso.

Todas las muestras que no contenían trombina se disolvieron en una solución acuosa ('buffer' o tampón de solubilización) a 95º C, de manera que contenían una concentración final de 0,1 M de Tris-HCl, 20 mg/mL de 'buffer' SDS y 7,7 mg/mL de DTT como agente reductor, para obtener una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 10 mg/mL.

Todas las muestras que contenían trombina se disolvieron en el 'buffer' de solubilización previamente descrito, que también contenía una concentración final de 2 mg/mL de Pefabloc® SC (4-(2-aminoetilo) bencenosulfonil fluoruro hidrocloruro), disponible a través de Fluka, Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE UU) y usado como inhibidor de la trombina para minimizar cualquier actividad de la trombina durante la preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon del siguiente modo: se preparó el 'buffer' de solubilización y se calentó a 95º C para cada muestra. Después, el 'buffer' de solubilización se añadió a un vial que contenía una solución de proteínas o proteínas secas para obtener una concentración de fibrinógeno/fibrina de aproximadamente 10 mg/mL. La mezcla resultante se removió manualmente y se conservó a 95º C hasta que se consiguió la reducción completa y la solubilización de las proteínas (hasta 3 horas).

La muestra de fibrinógeno purificada (≥95% de fibrinógeno coagulable) se obtuvo a través de Enzyme Research Laboratories (South Bend, Indiana, EE UU) y se disolvió en el 'buffer' de solubilización (tal y como se ha

descrito previamente) para obtener una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 10 mg/mL.

El componente de fibrinógeno del sellador de fibrina EVICEL® (BAC2) se utilizó para algunas pruebas. La concentración de fibrinógeno fue de 55-85 mg/mL y otras proteínas y excipientes también se incluyeron en la formación, incluyendo fibronectina, albúmina, hidrocloruro de arginina, glicina, cloruro de sodio y citrato de sodio.

De manera adicional, el componente de trombina del sellador de fibrina EVICEL® se utilizó para algunas pruebas. La actividad de la trombina fue de 800-1200 IU/mL y la formulación también contenía cloruro de calcio, albúmina humana, manitol y acetato de sodio.

Para la preparación de las muestras, el componente de fibrinógeno del sellador de fibrina se disolvió a 95º C en un 'buffer' de solubilización y a una concentración final de 0,1 M de Tris-HCl, 20 mg/mL de 'buffer' SDS y 7,7 mg/mL de DTT, para obtener una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 10 mg/mL.

Se preparó una muestra de coagulación de sellador de fibrina mezclando de forma simultánea volúmenes iguales de componentes de trombina y fibrinógeno de EVICEL® en un tubo de ensayo e incubando la muestra a una temperatura fisiológicamente óptima (por ejemplo, 37º C) durante hasta 2 horas para garantizar la completa formación de coágulos de fibrina. Después, la mezcla completamente coagulada se disolvió en el 'buffer' de solubilización para obtener una concentración de fibrinógeno/fibrina de aproximadamente 10 mg/mL, tal y como se ha descrito previamente.

El polvo (o polvos) de proteínas liofilizadas se extrajo de muestras secas de parches que contienen fibrinógeno agitando el tejido cubierto con fibrinógeno y trombina en un solvente (metil perfluoropropil éter), seguido de la evaporación del solvente. Una parte de este polvo se hidrató en un medio acuoso (200 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH de 7.4) y se incubó a una temperatura fisiológicamente óptima (por ejemplo, 37º C) durante hasta 2 horas para garantizar la completa formación de coágulos de fibrina. Después, los coágulos resultantes se disolvieron en el 'buffer' de solubilización para obtener una concentración de fibrinógeno/fibrina de aproximadamente 10 mg/mL, tal y como se ha descrito previamente.

Las muestras de parches que contienen fibrinógeno, expuestas a unas condiciones específicas de temperatura y humedad de 25º C / 60% de humedad relativa, se prepararon de la siguiente manera: las muestras de parches que contienen fibrinógeno se colocaron en una cámara ambiental con unas condiciones establecidas de 25º C / 60% de humedad relativa durante 1 hora o 24 horas. Opcionalmente, las muestras de parches que contienen fibrinógeno se secaron al vacío y se extrajeron sus polvos, tal y como se ha descrito previamente. Posteriormente, el extracto de polvos se disolvió en el 'buffer' de solubilización para obtener una concentración de aproximadamente 10 mg/mL de fibrinógeno, tal y como se ha descrito previamente.

Las muestras de parches que contienen fibrinógeno también se coagularon parcialmente mediante hidratación en un volumen limitado de medio acuoso (200 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH de 7.4) para permitir la formación de coágulos de fibrina y, después, opcionalmente se secaron al vacío. Posteriormente, se extrajeron los polvos y se disolvieron en el 'buffer' de solubilización para obtener una concentración de fibrinógeno/fibrina de aproximadamente 10 mg/mL, tal y como se ha descrito previamente.

El artículo de pruebas 'buffer de tratamiento de muestras' sólo contenía 'buffer' de solubilización, tal y como se ha descrito previamente.

Ejemplo 1. Inmunoensayo de 'Western blot'

Las muestras que se analizaron se enumeran en la Tabla 1. Tras una solubilización a aproximadamente una concentración de fibrinógeno/fibrina de 10 mg/mL, las muestras se diluyeron aún más en un 'buffer' de solubilización para optimizar las concentraciones de proteínas de las muestras para el SDS-PAGE. Después, las muestras se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida de un 4-12% en unas cantidades finales de fibrinógeno/fibrina que se muestran en la Tabla 1. Después, las proteínas se sometieron a electroforesis en gel usando técnicas de laboratorio estándares. El SDS-PAGE se realizó a 125 voltios hasta que la parte delantera del tinte alcanzó la base del gel. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de unión de proteínas (por ejemplo, nitrocelulosa) usando técnicas de laboratorio estándares.

Tras la transferencia, la membrana se incubó en una solución bloqueadora (por ejemplo, una solución que contenga caseína y/o detergente, como se sabe en este campo) para evitar los enlaces o uniones no específicos. Después, la membrana de nitrocelulosa se aclaró y se incubó a temperatura ambiente en una solución de anticuerpos monoclonales (anticuerpos primarios, [clon 1F7]) con una afinidad específica con la parte del fibrinopéptido A del fibrinógeno humano.

La membrana se lavó con un 'buffer' de lavado de anticuerpos (por ejemplo, una solución salina que contenga detergente, como es bien sabido en este campo) para retirar o eliminar cualquier anticuerpo sin unir y después se incubó en una solución de anticuerpos secundaria (IgG antirratón de cabra conjugado con fosfatasa

alcalina, disponible comercialmente) y se lavó de nuevo con un 'buffer' de lavado de anticuerpos para retirar o eliminar cualquier anticuerpo sin unir o enlazar.

El patrón de bandas se visualizó mediante la incubación de la membrana de nitrocelulosa en un sustrato para fosfatasa alcalina disponible comercialmente.

Ahora, en referencia a la Figura 3, se ofrece una imagen de la membrana de nitrocelulosa tras llevar a cabo el procedimiento de 'Western blot'. La Tabla 1 muestra las designaciones de las calles del 'Western blot' para las muestras analizadas y también muestra los resultados de las pruebas con la interpretación de los patrones de bandas.

TABLA 1. Información de carga de las muestras de prueba para 'Western blot' y resultados

Calle	**Descripción de la muestra**	**Cantidad de fibrinógeno/fibrina cargada (µg)**	**Interpretación de los resultados**
1	Marcador de peso molecular	N/A (no aplicable)	N/A
2	Fibrinógeno purificado	1,25	Fibrinógeno detectado en la muestra de fibrinógeno purificado
3	Componente del sellador de fibrina que contiene fibrinógeno	1,25	Fibrinógeno detectado en el componente de la muestra del sellador de fibrina que contiene fibrinógeno
4	Componente del sellador de fibrina que contiene fibrinógeno	0,63	Fibrinógeno detectado en el componente de la muestra del sellador de fibrina que contiene fibrinógeno
5	Sellador de fibrina coagulado	0,50	No se detectó fibrinógeno en la muestra del sellador de fibrina coagulado
6	Polvo(s) extraído(s) del parche seco que contiene fibrinógeno	2,13	Fibrinógeno detectado en el (los) polvo(s) extraído(s) de la muestra del parche seco que contiene fibrinógeno
7	Polvos hidratados extraídos de un parche que contiene fibrinógeno	2,13	No se detectó fibrinógeno en los polvos hidratados extraídos de la muestra de un parche que contiene fibrinógeno
8	Polvos extraídos de un parche que contiene fibrinógeno (tras 1 hora de humidificación)	2,13	Fibrinógeno detectado en los polvos extraídos de la muestra de un parche que contiene fibrinógeno (tras 1 hora de humidificación)
9	Polvos extraídos de un parche que contiene fibrinógeno (tras 24 horas de humidificación)	2,13	Fibrinógeno detectado en los polvos extraídos de la muestra de un parche que contiene fibrinógeno (tras 24 horas de humidificación)
10	Polvos extraídos de un parche que contiene fibrinógeno parcialmente coagulado	2,13	Se detectó un nivel intermedio de fibrinógeno (un patrón de bandas relativamente más tenue) en los polvos extraídos de la muestra de un parche que contiene fibrinógeno expuesta a un volumen limitado de medio acuoso

La Figura 3 y la Tabla 1 indican que el fibrinógeno se detectó con éxito en las muestras que contenían fibrinógeno no coagulado, esto es, el fibrinógeno se detectó en el fibrinógeno purificado (Calle 2), el componente que contenía fibrinógeno del sellador de fibrina disponible comercialmente (Calles 3, 4), y los extractos de polvos de parche que contiene fibrinógeno (secos y humidificados) (Calles 6, 8, 9). No se detectó fibrinógeno en las muestras completamente coaguladas, esto es, la muestra de sellador de fibrina coagulada (Calle 5) y los polvos hidratados extraídos de un parche que contiene fibrinógeno (Calle 7). Un nivel intermedio de fibrinógeno (señalado por el patrón de bandas relativamente más tenue) se detectó en los polvos extraídos de las muestras de parches que tienen fibrinógeno que se expusieron a un volumen limitado de medio acuoso (Calle 10). No se observó ninguna diferencia apreciable en los patrones de bandas entre los extractos de polvos de parches que contienen fibrinógeno secos y humidificados (25º C / 60% de humedad relativa, hasta 24 horas), lo cual indica que el parche que contiene fibrinógeno no se sometió a ninguna conversión apreciable de fibrinógeno en fibrina en estas condiciones.

Después de transferir las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa, el gel se tiñó con azul de Coomassie usando técnicas de laboratorio estándares para confirmar que la proteína estaba presente en todas las calles. En la Figura 4 se muestra una imagen del gel que indica que se detectó proteína en todas las calles. En las calles en las que no se detectó ningún fibrinógeno en el 'Western blot', es decir, en el sellador de fibrina coagulado (Calle 5) y el polvo extraído de un parche que contiene fibrinógeno que estaba completamente hidratado (Calle 7), estaban presentes cadenas α y β de fibrinógeno. En las calles en las que el fibrinógeno se detectó en el 'Western blot', es decir, en el fibrinógeno purificado (Calle 2), el componente que contenía fibrinógeno del sellador de fibrina (Calles 3, 4) y el polvo extraído de un parche que contiene fibrinógeno (Calles 6, 8, 9), estaban presentes cadenas Aα y Bβ de fibrinógeno.

Ejemplo 2. Inmunoensayo de 'Dot blot'

Se desarrolló un ensayo rápido de fibrinógeno utilizando un procedimiento de inmunoensayo de 'Dot blot'. Se omite el paso de electroforesis en gel del procedimiento anterior de 'Western blot', de manera que el enfoque se basó en proteínas grandes presentes en la muestra que eran adsorbidas en la membrana, mientras que las moléculas pequeñas como FpA se limpiaban (o arrastraban) antes del tratamiento con el anticuerpo anti-FpA. Después se realizó un procedimiento similar de inmunotransferencia, tal y como se describe más adelante.

Las muestras analizadas se enumeran en la Tabla 2. Se preparó una disposición de cuadrados de 1,5 cm x 1,5 cm en la membrana de nitrocelulosa de unión de proteínas. Tras la solubilización, se aplicó un volumen adecuado (por ejemplo, 2 µL) de muestra o material de control al centro de cada cuadrado. Se permitió que la muestra o el control se secaran completamente en la membrana. Después, la membrana de nitrocelulosa se incubó en una solución bloqueadora para evitar las uniones o enlaces no específicos.

La membrana se aclaró y se incubó a temperatura ambiente en una solución de anticuerpos monoclonales (anticuerpos primarios, [clon 1F7]) con una afinidad específica con la parte del fibrinopéptido A del fibrinógeno humano (igual que en el procedimiento de 'Western blot' descrito previamente) y después se lavó con 'buffer' para retirar o eliminar cualquier anticuerpo sin unir. La membrana se incubó en una solución de anticuerpos secundarios durante 1 hora (igual que en el procedimiento de 'Western blot' descrito previamente) y después se lavó con 'buffer' para retirar o eliminar cualquier anticuerpo sin unir. La membrana se incubó con un sustrato para fosfatasa alcalina disponible comercialmente (igual que en el procedimiento de 'Western blot' descrito previamente) hasta que las intensidades de los puntos se habían desarrollado adecuadamente para ser visibles (por ejemplo, 5-30 minutos); después, la membrana se aclaró para detener la reacción.

Posteriormente, el tamaño y la intensidad del área teñida se cuantificó mediante densitometría óptica y se evaluó la relación con la concentración de fibrinógeno.

Ahora, en referencia a la Figura 5, se ofrece una imagen de la membrana de nitrocelulosa después de realizar el procedimiento de 'Dot blot', de manera que los números se corresponden con los números de muestra, tal y como se enumeran en la Tabla 2. La Tabla 2 muestra las descripciones de las muestras, la cantidad de proteína de fibrinógeno/fibrina cargada, la densidad óptica de las áreas teñidas de la membrana tal y como se midió mediante densitometría y los resultados de la prueba con la interpretación de los patrones observados. La densidad óptica se expresa por medio de un número en la escala de grises, que va desde el 0, correspondiente al negro absoluto (alto contenido de fibrinógeno), al 255, correspondiente al blanco (ausencia de fibrinógeno).

TABLA 2. Información de carga de las muestras de prueba para 'Dot blot' y resultados

Muestra/Control	Cantidad de fibrinógeno/fibrina cargada (µg)	Densidad óptica	Resultados de detección
1. 'Buffer' de tratamiento de muestra	0	223	No se observó ninguna mancha o tinción
2. Vacío	N/A	232	No se observó ninguna mancha o tinción
3. Polvo hidratado extraído de un parche que contiene fibrinógeno	0,850	238	No se detectó ningún fibrinógeno en el extracto de polvo hidratado de un parche que contiene fibrinógeno completamente humedecido y coagulado
4. Polvo hidratado extraído de un parche que contiene fibrinógeno	0,425	236	No se detectó ningún fibrinógeno en el extracto de polvo hidratado de un parche que contiene fibrinógeno que se humedeció y coaguló por completo
5. Polvo hidratado extraído de un parche que contiene fibrinógeno	0,213	230	No se detectó ningún fibrinógeno en el extracto de polvo hidratado de un parche que contiene fibrinógeno que se humedeció y coaguló por completo
6. Extracto de polvo seco de un parche que contiene fibrinógeno	0,850	178	Fibrinógeno detectado
7. Extracto de polvo seco de un parche que contiene fibrinógeno	0,425	193	Fibrinógeno detectado
8. Extracto de polvo seco de un parche que contiene fibrinógeno	0,213	222	Fibrinógeno detectado
9. Extracto de polvo seco de un parche que contiene fibrinógeno	0,106	231	Fibrinógeno detectado
10. Extracto de polvo seco de un parche que contiene fibrinógeno	0,053	224	Fibrinógeno detectado
11. Polvo extraído de un parche que contiene fibrinógeno (tras una humidificación de 1 hora)	0,425	185	Fibrinógeno detectado
12. Polvo extraído de un parche que contiene fibrinógeno (tras una humidificación de 24 horas)	0,425	192	Fibrinógeno detectado
13. Polvo extraído de muestras de parche que contiene fibrinógeno parcialmente coaguladas	0,425	217	Fibrinógeno detectado

(continuación)

Muestra/Control	Cantidad de fibrinógeno/fibrina cargada (µg)	Densidad óptica	Resultados de detección
14. Polvo extraído de muestras de parche que contiene fibrinógeno completamente coaguladas	0,425	233	No se detectó ningún fibrinógeno cuando el parche que contiene fibrinógeno se coaguló por completo
15. Vacío	N/A	226	No se observó ninguna mancha ni tinción

Ahora, en referencia a la Figura 6, se presenta una gráfica que muestra la relación entre las concentraciones de fibrinógeno y la intensidad de la mancha o tinción. Los valores de la densidad óptica en la escala de grises en la membrana de 'Dot blot' se trazaron como una función del log de la concentración de la proteína (fibrinógeno) presente en la muestra. El análisis se realizó con las muestras 6-9, tal y como se enumeran en la Tabla 2, de manera que la carga de fibrinógeno/fibrina osciló entre 0,850 µg y 0,106 µg. La intensidad del manchado o tinción del fibrinógeno era proporcional a la cantidad de fibrinógeno presente en la muestra (r^2=0,96).

El análisis de los datos presentados en las Figuras 5-6 y la Tabla 2 indica que la intensidad del manchado o tinción del fibrinógeno era proporcional a la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra. No se observó ningún manchado o tinción apreciable con el 'buffer' de muestras o con el vacío (muestras 1, 2 y 15) y no se detectó ningún fibrinógeno en el polvo hidratado extraído del parche que contiene fibrinógeno, que se preparó hidratando por completo el polvo biológico (muestras 3-5) o cuando todo el parche que contiene fibrinógeno estaba completamente coagulado (muestra 14). Se detectó fibrinógeno en los extractos de polvo secos del parche que contiene fibrinógeno (muestras 6-10) y en las muestras del parche que contiene fibrinógeno que se expusieron a la humedad durante 1 hora (muestra 11) o 24 horas (muestra 12), y en el polvo extraído de muestras de parche que contiene fibrinógeno parcialmente coaguladas (muestra 13).

Diagrama de bloques del proceso

Ahora, en referencia a las Figuras 7 y 8, se presentan unos diagramas de bloque del método de la invención para 'Western blot' y 'Dot blot', respectivamente.

De acuerdo con una realización de la presente invención, un método para detectar fibrinógeno intacto usando 'Western blot' comprende los siguientes pasos: (a) solubilizar o disolver la muestra e inhibir la trombina; (b) realizar un SDS-PAGE; (c) transferir la muestra a una membrana de unión de proteínas; (d) el paso de bloqueo; (e) hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en una membrana con un anticuerpo primario monoclonal; (f) el paso de lavado para retirar los anticuerpos primarios sin reaccionar; (g) hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal con un anticuerpo secundario que tiene un marcador; (h) el paso de lavado para retirar o eliminar los anticuerpos secundarios sin reaccionar; y (i) detectar la cantidad de fibrinógeno intacto cuantificando la cantidad del marcador.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, un método para detectar fibrinógeno intacto usando 'Dot blot' comprende los siguientes pasos: (a) solubilizar o disolver la muestra e inhibir la trombina; (b) aplicar la muestra a una membrana de unión de proteínas; (c) el paso de bloqueo; (d) hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la membrana con un anticuerpo primario monoclonal; (e) el paso de lavado para retirar los anticuerpos primarios sin reaccionar; (f) hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal con un anticuerpo secundario que tiene un marcador; (g) el paso de lavado para retirar o eliminar los anticuerpos secundarios sin reaccionar; y (h) detectar la cantidad de fibrinógeno intacto cuantificando la cantidad del marcador.

Si bien los ejemplos previos explican diversas realizaciones de la invención, no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención, sino que contribuyen a una descripción más completa de esta.

Reivindicaciones

1. Un método para detectar fibrinógeno intacto en una muestra que contiene al menos un poco de fibrinógeno, de manera que el método comprende los siguientes pasos o etapas:

(a) solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante que inhibe la actividad de trombina;
(b) transferir una parte de la mencionada muestra a un gel y someter dicha parte a electroforesis;
(c) transferir una porción de la mencionada parte de la muestra del mencionado gel a una membrana de unión de proteínas e inmovilizar el fibrinógeno en dicha membrana;
(d) someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de bloqueo;
(e) hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A o fibrinopéptido B para formar un compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos;
(f) someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo monoclonal primario sin unir;
(g) hacer reaccionar el mencionado anticuerpo monoclonal que ha formado el compuesto complejo fibrinógeno-anticuerpos con un anticuerpo secundario que tiene un marcador;
(h) someter la mencionada membrana a al menos una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo secundario sin unir que tenga un marcador; y
(i) detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de marcador presente.

2. El método de la reivindicación 1, de manera que el mencionado método utiliza SDS-PAGE y 'Western blot'.

3. Un método para detectar fibrinógeno intacto en una muestra que contiene al menos un poco de fibrinógeno, de manera que el método comprende los siguientes pasos o etapas:

(a) solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante que inhibe la actividad de trombina;
(b) aplicar una parte de la mencionada muestra a una membrana de unión de proteínas e inmovilizar el fibrinógeno en dicha membrana;
(c) someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de bloqueo y extraer o eliminar el fibrinopéptido A escindido del fibrinógeno de la mencionada membrana;
(d) hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A para formar un compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos;
(e) someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo monoclonal primario sin unir;
(f) hacer reaccionar el mencionado anticuerpo monoclonal que ha formado el compuesto complejo fibrinógeno-anticuerpos con un anticuerpo secundario que tiene un marcador;
(g) someter la mencionada membrana a al menos una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo secundario sin unir que tenga un marcador; y
(h) detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de marcador presente.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mencionada muestra contiene una cantidad desconocida de fibrinógeno intacto.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mencionada muestra es sólida, líquida o semilíquida.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mencionada muestra contiene trombina y fibrinógeno liofilizados.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mencionado anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a la fracción de fibrinopéptido A es el clon 1F7.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mencionado anticuerpo secundario que tiene un marcador es IgG antirratón de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mencionado paso de detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad del marcador se realiza incubando la membrana de unión de proteínas con un sustrato para fosfatasa alcalina.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mencionado marcador es un marcador detectable electroquímicamente, un marcador detectable colorimétricamente, un marcador detectable radiológicamente, un marcador detectable magnéticamente o un marcador fluorescente.

11. Un método para evaluar el rendimiento o la estabilidad de un dispositivo hemostático que contiene al menos un componente biológico que es fibrinógeno, y que incluye comparar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en una muestra que se ha obtenido de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en relación con el nivel de umbral del fibrinógeno intacto.

12. Un método para detectar fibrinógeno intacto en una muestra que contiene al menos un poco de fibrinógeno, de manera que el método comprende los siguientes pasos:

(a) solubilizar o disolver la muestra en una solución solubilizante que inhibe la actividad de trombina;
(b) transferir una parte de la mencionada muestra a una membrana de unión de proteínas e inmovilizar el fibrinógeno en dicha membrana;
(c) someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de bloqueo y extraer o eliminar el fibrinopéptido A escindido del fibrinógeno de la membrana mencionada;
(d) hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la mencionada membrana con un anticuerpo monoclonal primario que puede unirse a una fracción de fibrinopéptido A para formar un compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos; y
(e) detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de anticuerpo monoclonal primario que forma el compuesto complejo de fibrinógeno-anticuerpos.

13. El método de la reivindicación 12, de manera que el mencionado paso (e) para detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra se realiza mediante los siguientes pasos:

(a) someter la mencionada membrana a al menos un paso o etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo monoclonal primario sin unir;
(b) hacer reaccionar el mencionado anticuerpo monoclonal que ha formado el compuesto complejo fibrinógeno-anticuerpos con un anticuerpo secundario que tiene un marcador;
(c) someter la mencionada membrana a al menos una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo secundario sin unir que tenga un marcador; y
(d) detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra cuantificando la cantidad de marcador presente.

14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el mencionado anticuerpo monoclonal primario está conjugado con un marcador, de manera que el mencionado marcador es un marcador detectable electroquímicamente, un marcador detectable colorimétricamente, un marcador detectable radiológicamente, un marcador detectable magnéticamente o un marcador fluorescente, y de manera que el mencionado paso (f) para detectar la cantidad de fibrinógeno intacto presente en la muestra se realiza cuantificando la cantidad de marcador presente.

FIGURA 1.

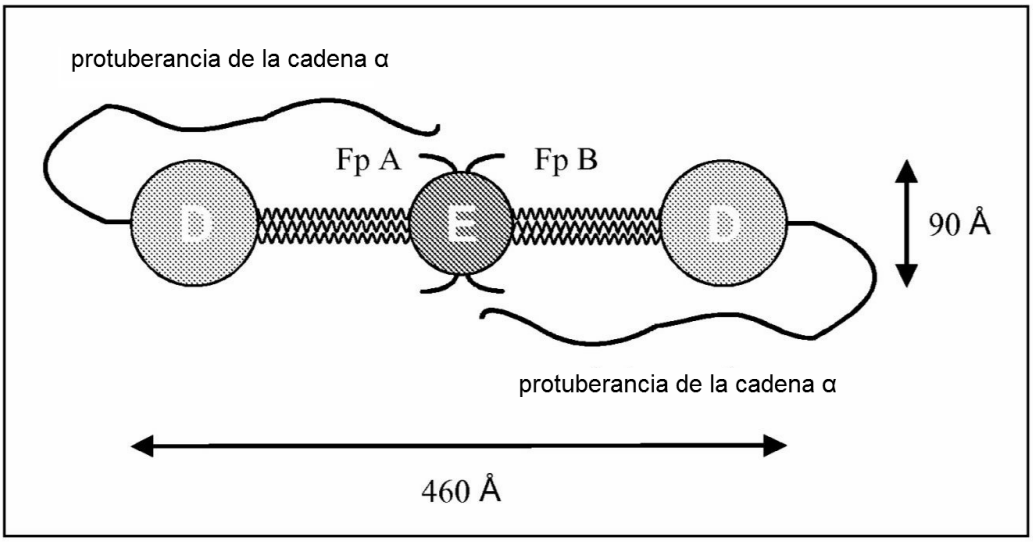

protuberancia de la cadena α
Fp A
Fp B
D
E
D
90 Å
protuberancia de la cadena α
460 Å

FIGURA 2.

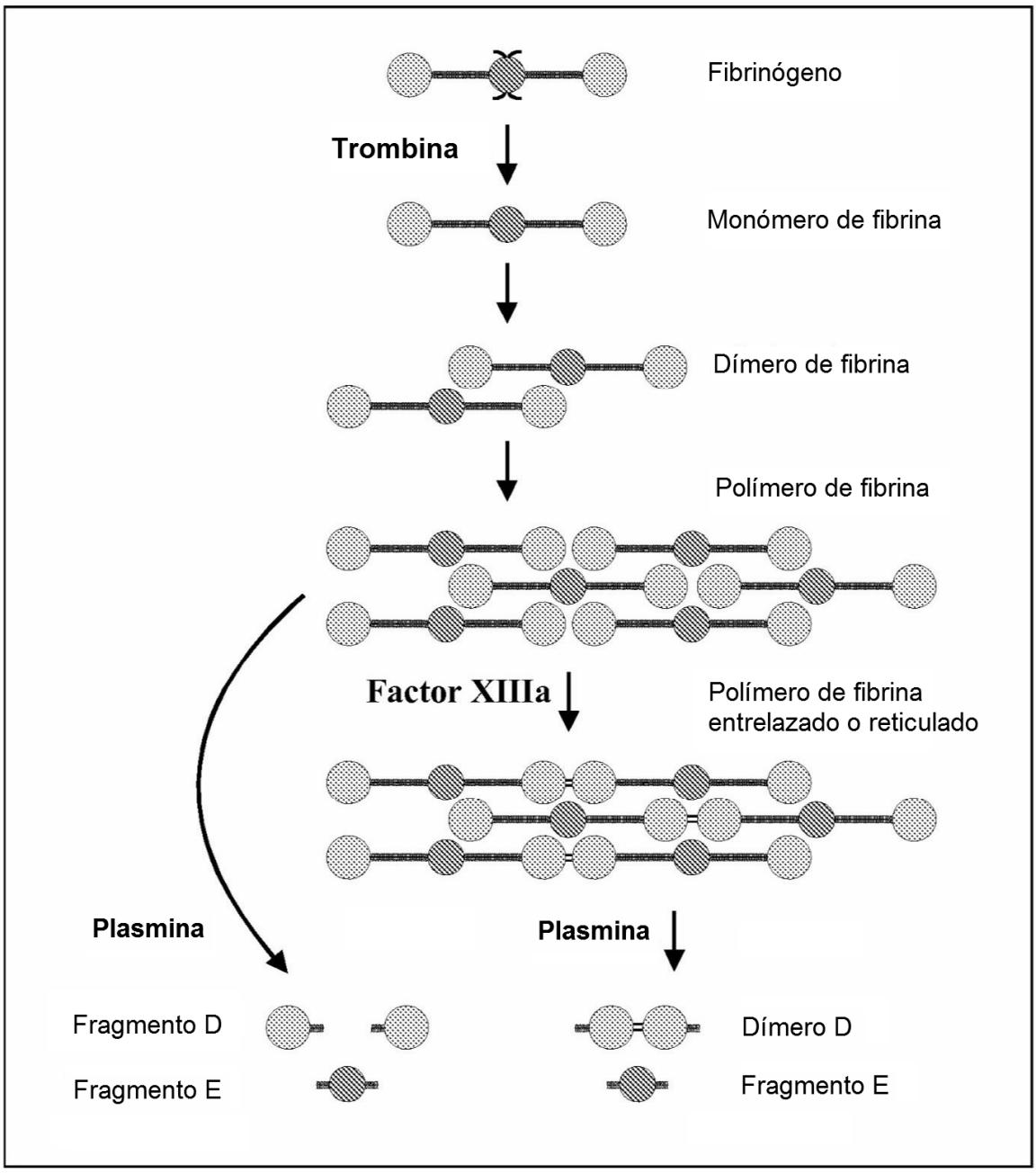

Fibrinógeno
Trombina
Monómero de fibrina
Dímero de fibrina
Polímero de fibrina
Factor XIIIa
Polímero de fibrina entrelazado o reticulado
Plasmina
Plasmina
Fragmento D
Fragmento E
Dímero D
Fragmento E

FIGURA 3.

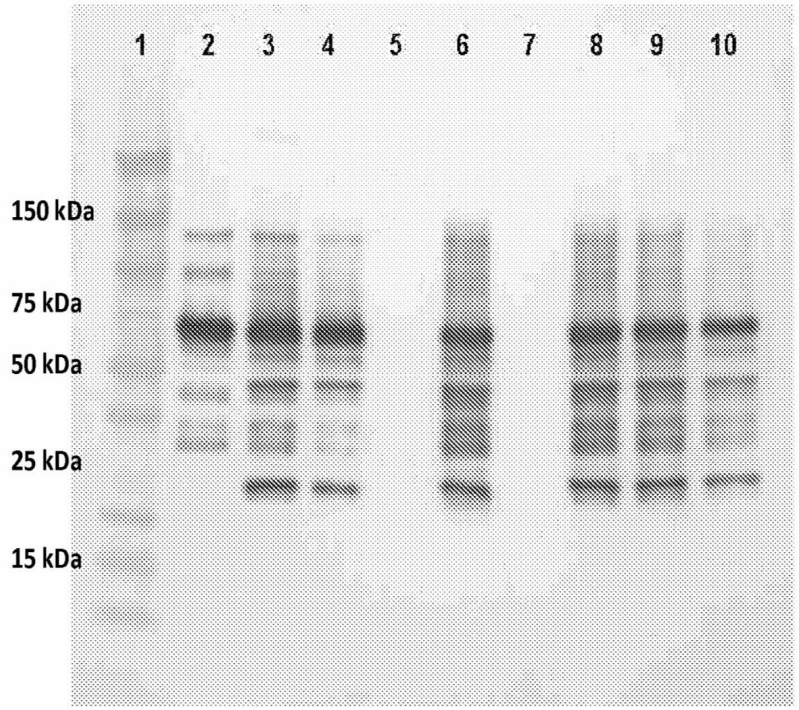


FIGURA 4.

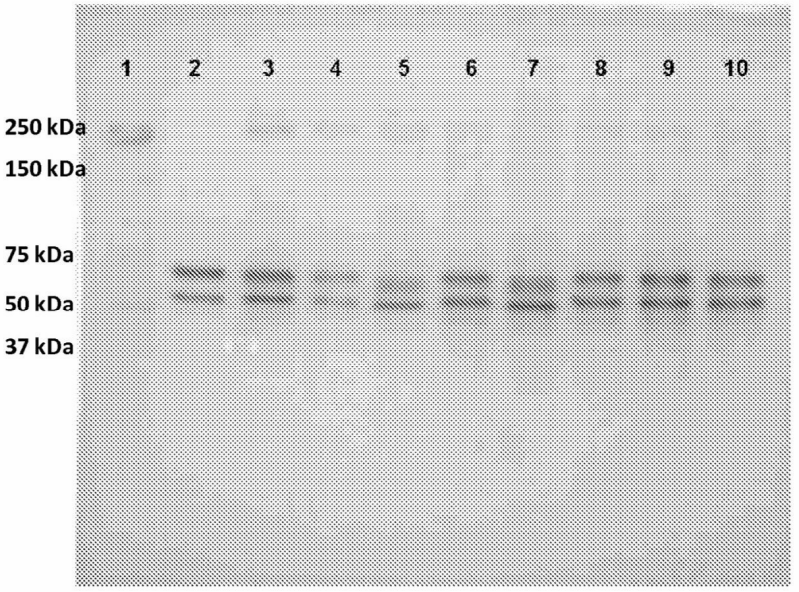


FIGURA 5.

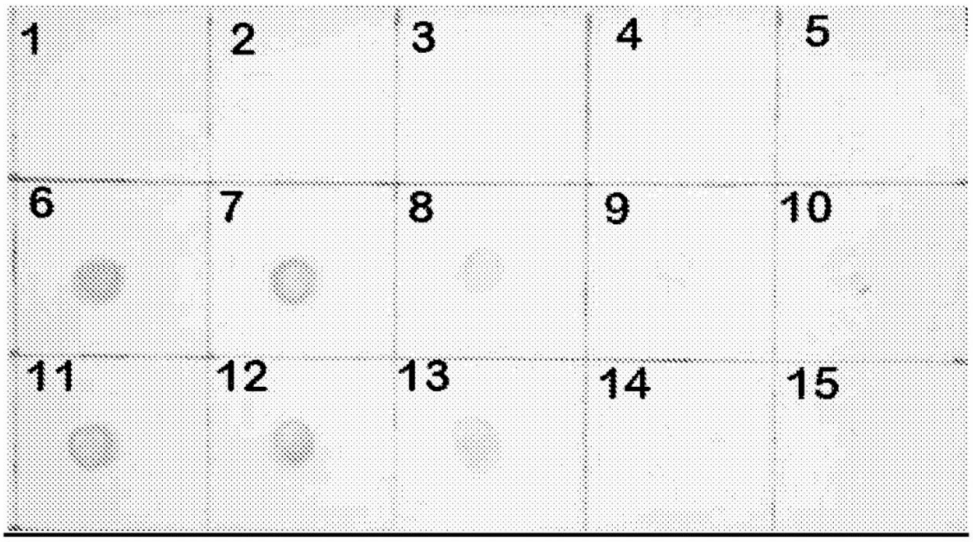


FIGURA 6.

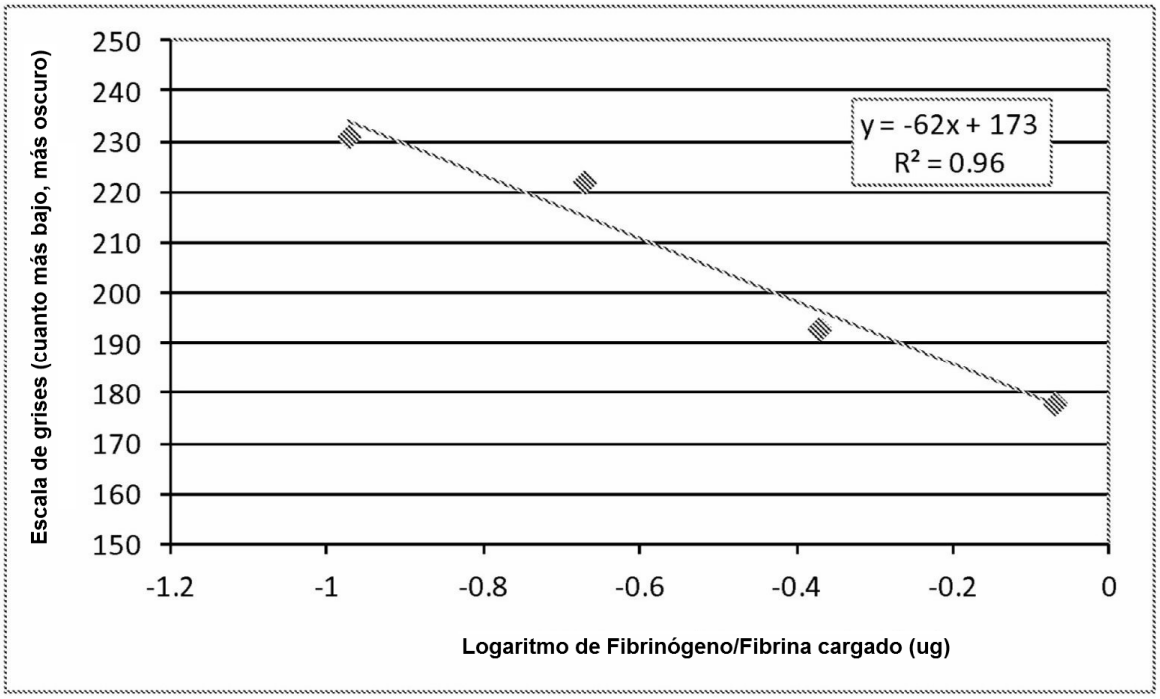

Escala de grises (cuanto más bajo, más oscuro)
250
240
230
220
210
200
190
180
170
160
150
-1.2
-1
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0
y = -62x + 173
R² = 0.96
Logaritmo de Fibrinógeno/Fibrina cargado (ug)

FIGURA 7.

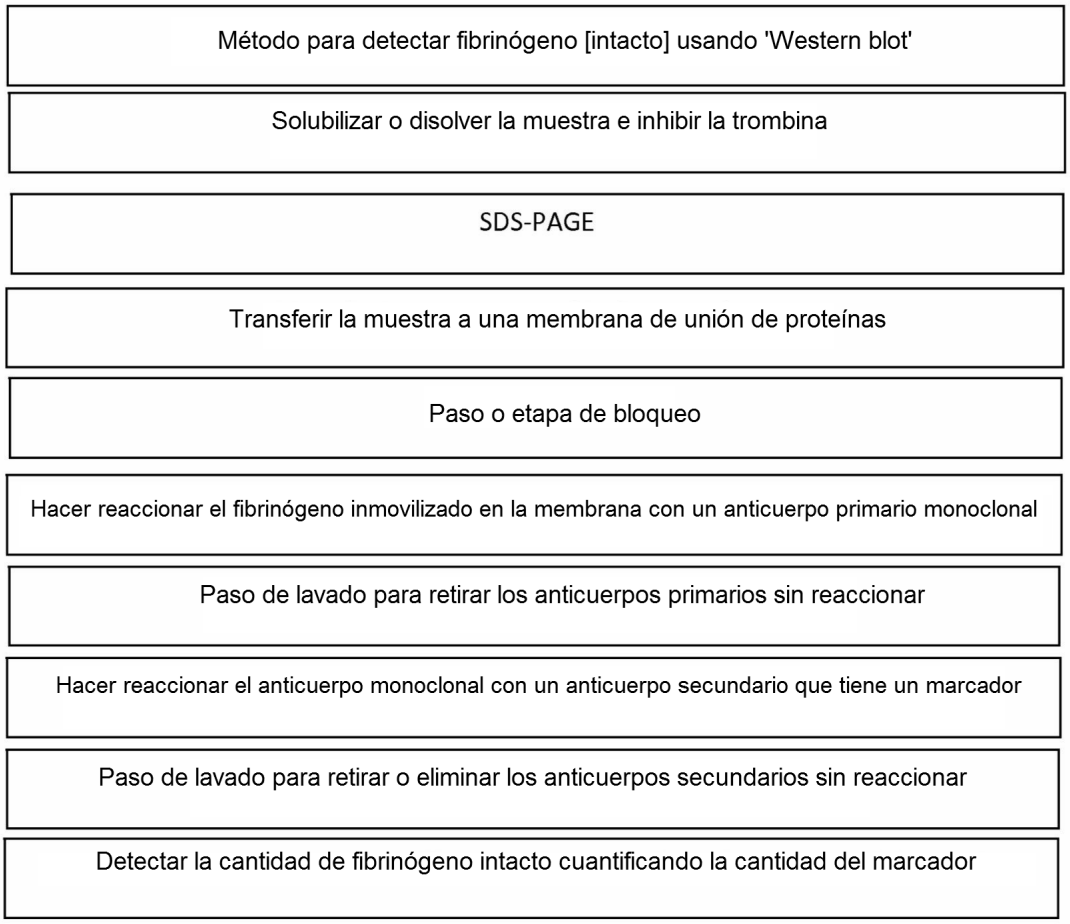
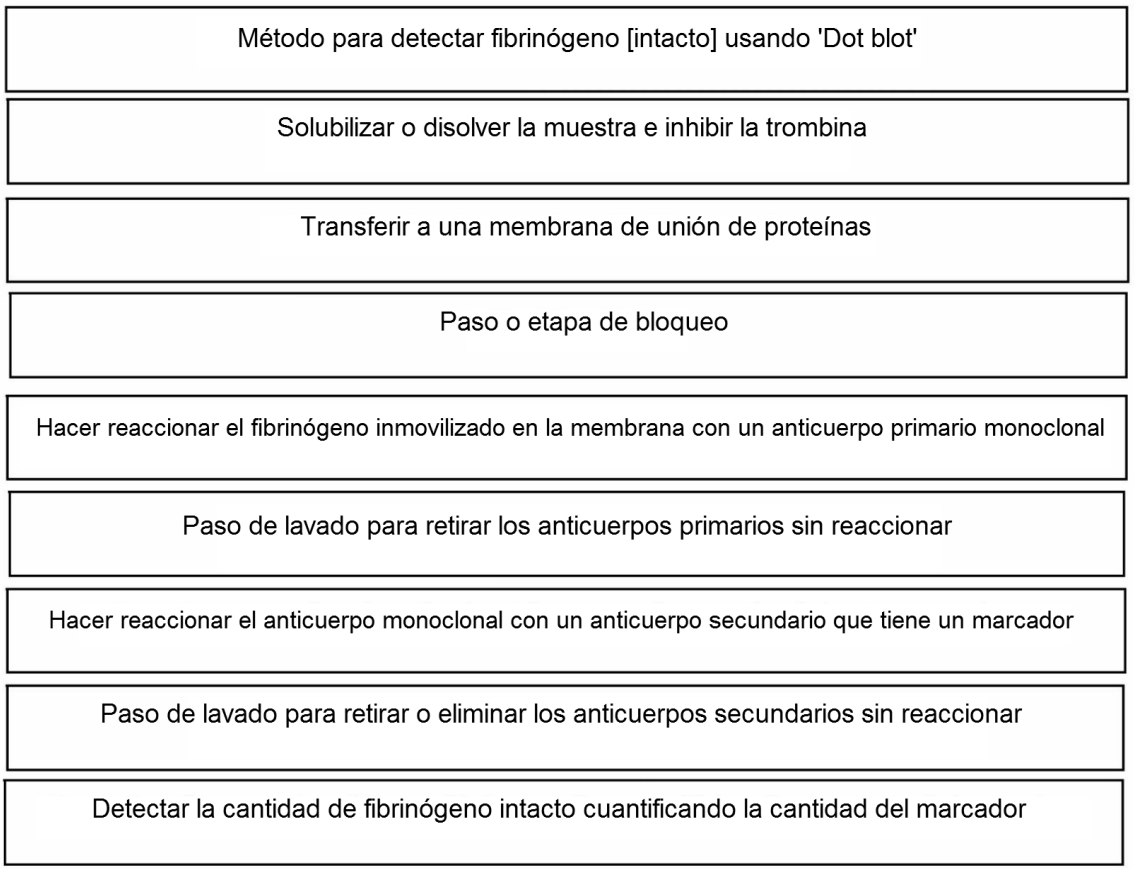

Método para detectar fibrinógeno [intacto] usando 'Western blot'
Solubilizar o disolver la muestra e inhibir la trombina
SDS-PAGE
Transferir la muestra a una membrana de unión de proteínas
Paso o etapa de bloqueo
Hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la membrana con un anticuerpo primario monoclonal
Paso de lavado para retirar los anticuerpos primarios sin reaccionar
Hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal con un anticuerpo secundario que tiene un marcador
Paso de lavado para retirar o eliminar los anticuerpos secundarios sin reaccionar
Detectar la cantidad de fibrinógeno intacto cuantificando la cantidad del marcador

FIGURA 8.


Método para detectar fibrinógeno [intacto] usando 'Dot blot'
Solubilizar o disolver la muestra e inhibir la trombina
Transferir a una membrana de unión de proteínas
Paso o etapa de bloqueo
Hacer reaccionar el fibrinógeno inmovilizado en la membrana con un anticuerpo primario monoclonal
Paso de lavado para retirar los anticuerpos primarios sin reaccionar
Hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal con un anticuerpo secundario que tiene un marcador
Paso de lavado para retirar o eliminar los anticuerpos secundarios sin reaccionar
Detectar la cantidad de fibrinógeno intacto cuantificando la cantidad del marcador