

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 595**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/579** (2006.01)

**C07K 5/103** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/JP2013/085234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13868898 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2940468**

54 Título: **Agente de pre-tratamiento y método de pre-tratamiento para antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus**

30 Prioridad:

**28.12.2012 JP 2012287475**

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

**18.11.2019**

73 Titular/es:

**SEIKAGAKU CORPORATION (100.0%)  
6-1 Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-0005, JP**

72 Inventor/es:

**AIZAWA, MAKI;  
ODA, TOSHIO y  
AKETAGAWA, JUN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 731 595 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

Agente de pre-tratamiento y método de pre-tratamiento para antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus

La presente invención se refiere al uso de una sal de metal divalente en el pretratamiento de antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus, a métodos de pretratamiento de antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus, y a métodos para medir una sustancia diana de una prueba de Limulus contenida en antitrombina III.

En la presente invención, se pueden emplear las siguientes abreviaturas.

Et: endotoxina

BG: (1 → 3) -β-D-glucano

AT III: antitrombina III

La endotoxina es un lipopolisacárido que está presente en la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas y se sabe que es un pirógeno fuerte. También se sabe que la endotoxina causa diversas afecciones patológicas que incluyen no solamente fiebre sino también choque y similares. Por lo tanto, la detección y cuantificación de la endotoxina es esencial en productos farmacéuticos tales como una preparación inyectable, agua, dispositivos médicos, y similares, desde el punto de vista de garantizar la seguridad de los productos farmacéuticos y similares.

Como se sabe, el cangrejo herradura experimenta coagulación de la sangre cuando se infecta con una bacteria Gram negativa. Este fenómeno se ha empleado convencionalmente para la detección de endotoxinas. Es decir, la endotoxina se puede determinar mediante el uso de extractos de corpúsculo sanguíneo de cangrejo herradura (es decir, producto lisado de amebocitos de Limulus, en lo sucesivo denominado "LAL"). Este método se denomina "prueba de Limulus", que emplea una reacción en cascada de una variedad de proteínas (todas serina proteasas) presentes en LAL, reacción que se produce a través del contacto entre la endotoxina y LAL.

La AT III es un anticoagulante de la sangre y se utiliza para el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada (DIC) o similar. Dado que la AT III es un inhibidor de la serina proteasa, inhibe las actividades de las proteínas que están presentes en LAL y que están involucradas en la reacción en cascada (Documento no de patente 1). De ese modo, en algunos casos, un cierto tipo de espécimen inhibe un reactivo de Limulus. Semejante acción inhibitoria se puede evitar diluyendo un espécimen (Documento no de patente 2). Sin embargo, la AT III muestra una acción inhibitoria muy fuerte sobre un reactivo de Limulus y, por lo tanto, para llevar a cabo la prueba de Limulus de una preparación de AT III (inyección), la preparación debe diluirse a un factor de dilución de 64 o superior (Documento no de patente 2). Por lo tanto, tomando en consideración la sensibilidad de detección de un reactivo de Limulus (es decir, la concentración más baja de endotoxinas en la curva de calibración), se considera difícil someter una preparación de AT III a una prueba de Limulus (Documento no de patente 2). En realidad, incluso en la actualidad, la detección de endotoxinas en especímenes que contienen cada uno AT III se realiza a través de la prueba de pirógeno en conejos (Documento no de patente 1).

El Documento no de patente 1 describe un método para determinar Et en una preparación de AT III, en cuyo método la preparación de AT III se diluye 100 veces; el producto diluido se calienta a 70°C durante 20 minutos como pretratamiento; el producto pretratado se hace reaccionar con LAL; y se detecta Et a través del método de dispersión de luz. Una característica técnica del método reside en el empleo del método de dispersión de luz por medio de un aparato de medición de dispersión de luz en lugar de un ensayo turbidimétrico por medio de un espectrofotómetro, para lograr una alta sensibilidad en la detección de Et. Sin embargo, de manera similar al caso mencionado anteriormente, el método requiere la dilución del espécimen a un alto factor de dilución, e implica al menos los siguientes problemas.

(1) Los espectrofotómetros se emplean ampliamente como un aparato de medición para la prueba de Limulus, y además se debe proporcionar un aparato de medición de dispersión de luz y utilizarlo para llevar a cabo el método de dispersión de luz.

(2) La Farmacopea Japonesa especifica solamente el ensayo turbidimétrico y el ensayo cromogénico como métodos de ensayo fotométrico de Et, y guarda silencio en lo que respecta a un método de dispersión de luz.

El Documento de patente 1 describe un método de ensayo de Et y BG para muestras biológicas, comprendiendo el método poner una muestra biológica en contacto con un sulfato de metal alcalinotérreo o un haluro de metal alcalinotérreo, calentar la mezcla como pretratamiento y someter a continuación el producto pretratado a un ensayo mediante el uso de un reactivo de Limulus.

El Documento de patente 2 describe un método de ensayo de Et y BG para muestras de sangre, comprendiendo el método mezclar una muestra biológica con un compuesto de hexadimetrina, un hidróxido de metal alcalino, un tensioactivo no iónico y un haluro de metal alcalinotérreo, calentar la mezcla como pretratamiento y a continuación

someter el producto pretratado a un ensayo mediante el uso de un reactivo de Limulus.

5 El Documento de patente 3 describe un método de ensayo de Et para una muestra que posiblemente contenga AT III, comprendiendo el método poner una muestra biológica en contacto con un portador en el que se inmoviliza el péptido de unión a lipopolisacárido y/o el péptido de unión a lípido A para recuperar de ese modo Et a través de la absorción en el portador, y a continuación someter la Et recuperada a un ensayo mediante el uso de un reactivo de Limulus o similar.

Por otra parte, el documento EP 0 569 033 A2 describe el pretratamiento de sistemas de reactivos como medio para desnaturalizar o eliminar factores que interfieren en reacciones bioquímicas, y también como método para la utilización de estos.

10 Sin embargo, ninguno de los documentos mencionados anteriormente describe o sugiere someter a la AT III a un tratamiento de inactivación de proteínas como pretratamiento en presencia conjunta de una sal de metal divalente para llevar a cabo la prueba de Limulus de AT III.

### Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

15 Documento de patente 1: WO 2006/080448

Documento de patente 2: Solicitud de Patente Japonesa (*Kokai*) Núm. Hei 6-70796

Documento de patente 3: Solicitud de Patente Japonesa (*Kokai*) Núm. 2010-243342

### Documentos no de patentes

20 Documento no de patente 1: Endotoxin and natural Immunity Research 15 -Rapidly Developing Natural Immunity Research-, Igakutosho-shuppan Ltd., pág. 27 a 30, 2012

Documento no de patente 2: Endotoxin Research 12 -New Development in Natural Immunity Research-, Igakutosho-shuppan Ltd., pág. 93 a 97, 2009

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar medios para reducir la interferencia de la reacción observada cuando AT III se somete a prueba de Limulus, por lo que la prueba de Limulus de AT III se puede llevar a cabo con gran precisión. El término "interferencia de la reacción" referido en la presente memoria se refiere a cualquier acción que esté causada por un factor diferente de las sustancias diana de la prueba de Limulus (p. ej., Et y BG) y que afecte a los resultados de la prueba de Limulus. Por lo tanto, la "interferencia de la reacción" abarca, por ejemplo, todas las acciones que afectan los resultados de la prueba de Limulus causadas por la propia AT III, un componente tal como un aditivo o una impureza que está presente juntamente con AT III, un componente tal como un reactivo distinto de un agente de pretratamiento que está presente conjuntamente en el pretratamiento, y/o un componente contenido en un reactivo de Limulus; tal como una acción de insolubilización de cualquiera de estos componentes, una acción de promoción o inhibición de la reacción de un reactivo de Limulus, y una acción de cambio de la estructura de la micela de Et o la estructura estérica de BG para modificar de ese modo la actividad de Et o BG (reactividad al Factor C o el Factor G contenidos en un reactivo de Limulus).

35 Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios exhaustivos con el fin de lograr el objeto anteriormente mencionado, y han descubierto que la interferencia de la reacción observada cuando AT III se somete a la prueba de Limulus se puede reducir sometiendo la AT III a un tratamiento de inactivación de la proteína tal como un tratamiento térmico o un tratamiento con ácido con presencia conjunta de una sal de metal divalente, por medio de lo cual se puede llevar a cabo la prueba de Limulus de AT III con una gran exactitud. La presente invención se ha completado basándose en este descubrimiento.

40 Por consiguiente, la presente invención abarca los siguientes apartados.

1. El uso de una sal de metal divalente en el pretratamiento para la antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus,

45 cuya sal de metal divalente se utiliza para someter la antitrombina III a un tratamiento de inactivación de proteína con presencia conjunta de la sal de metal divalente, antes de someter la antitrombina III a prueba de Limulus,

en donde el tratamiento de inactivación de proteína no es un tratamiento con álcali en el que la antitrombina III presente juntamente con la sal de metal divalente se pone en contacto con un álcali, y

en donde la antitrombina III es una preparación inyectable de antitrombina III.

50 2. El uso de acuerdo con el apartado 1, en donde la sal de metal divalente es una o más sales metálicas

seleccionadas del grupo que consiste en un cloruro de metal divalente, un acetato de metal divalente y un sulfato de metal divalente.

- 5 3. El uso de acuerdo con el apartado 1 o 2, en donde el metal divalente que constituye la sal de metal divalente es uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en magnesio, calcio, manganeso y cinc.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de los apartados 1 a 3, en donde la concentración del ión metálico divalente derivado de la sal de metal divalente es de 0,5 mM o mayor cuando la antitrombina III está presente junto con la sal de metal divalente.
- 10 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de los apartados 1 a 4, en donde una sustancia diana de la prueba de Limulus es endotoxina.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de los apartados 1 a 5, en donde la sal de metal divalente está comprendida como agente de pretratamiento en un kit de reactivos de Limulus.
- 15 7. Un método de pretratamiento de antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus, comprendiendo el método someter la antitrombina III a un tratamiento de inactivación de proteína con presencia conjunta de un agente de pretratamiento que contiene una sal de metal divalente,  
en donde el tratamiento de inactivación de proteína no es un tratamiento con álcali en el que la antitrombina III presente juntamente con la sal de metal divalente se pone en contacto con un álcali, y  
en donde la antitrombina III es una preparación inyectable de antitrombina III.
- 20 8. El método de pretratamiento de acuerdo con el apartado 7, en donde la sal de metal divalente es una o más sales de metales seleccionadas del grupo que consiste en un cloruro de metal divalente, un acetato de metal divalente, y un sulfato de metal divalente.
9. El método de pretratamiento de acuerdo con el apartado 7 u 8, en donde el metal divalente que constituye la sal de metal divalente es uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en magnesio, calcio, manganeso, y cinc.
- 25 10. El método de pretratamiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7 a 9, en donde la concentración del ión de metal divalente derivado de la sal de metal divalente es de 0,5 M o mayor cuando la antitrombina III está presente juntamente con el agente de pretratamiento.
11. El método de pretratamiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7 a 10, en donde la sustancia diana de la prueba de Limulus es una endotoxina.
- 30 12. El método de pretratamiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7 a 11, en donde el tratamiento de inactivación de proteína es un tratamiento térmico o un tratamiento con ácido.
13. El método de pretratamiento de acuerdo con el apartado 12, en donde el tratamiento térmico se realiza a una temperatura superior a 50°C.
- 35 14. El método de pretratamiento de acuerdo con el apartado 12, en donde el ácido empleado en el tratamiento con ácido es ácido clorhídrico.
15. Un método para medir la sustancia diana de la prueba de Limulus contenida en antitrombina III, comprendiendo el método el tratamiento preliminar de la antitrombina III a través del método de tratamiento de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7 a 14, y someter la antitrombina III tratada de manera preliminar a una prueba de Limulus.

40 Las Figuras muestran:

[Fig. 1] Una gráfica que muestra los resultados de la prueba del ensayo de líneas paralelas.

[Fig. 2] Una gráfica que muestra los resultados de la prueba del ensayo de líneas paralelas.

[Fig. 3] Una gráfica que muestra los resultados de la prueba del ensayo de líneas paralelas.

(1) El agente de pretratamiento

45 El agente de pretratamiento descrito en la presente memoria es un agente de pretratamiento para AT III que se va a someter a una prueba de Limulus, cuyo agente contiene una sal de metal divalente. El agente de pretratamiento descrito en la presente memoria se utiliza para someter la antitrombina III a un tratamiento de inactivación de proteínas con presencia conjunta del agente de pretratamiento, antes de someter la antitrombina III a una prueba de Limulus.

El término "prueba de Limulus" referido en la presente memoria se refiere a una prueba para detectar (medir) una sustancia diana mediante el uso de un reactivo de Limulus. La sustancia diana también se puede denominar "sustancia diana de la prueba de Limulus (sustancia diana de la prueba de Limulus)". La sustancia diana de la prueba de Limulus no está particularmente limitada siempre que sea una sustancia detectable por la prueba de Limulus. La sustancia diana es preferiblemente Et o BG, y más preferiblemente Et.

La "AT III" a la que se hace referencia en la presente memoria no está particularmente limitada siempre que sea un espécimen que contenga AT III. La "AT III" a la que se hace referencia en la presente memoria puede consistir en AT III, o puede contener adicionalmente un componente distinto de AT III. La forma de AT III tampoco está particularmente limitada. Por ejemplo, la AT III puede estar en forma de líquido, o puede estar en forma de un sólido tal como un producto liofilizado, polvo, gránulos o comprimidos.

Un ejemplo de AT III es una preparación inyectable de AT III. Los ejemplos específicos de tales preparaciones inyectables incluyen Neuart (marca registrada; producto de Benesis Co., Ltd.), Anthrobin (producto de The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), y Nonthron (marca registrada; producto de Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.). Cuando tal preparación inyectable de AT III se somete al método de pretratamiento descrito en la presente memoria y a la prueba de Limulus, se puede utilizar su solución no diluida como espécimen, se puede utilizar una solución concentrada de la misma como espécimen o se puede utilizar una solución diluida a cualquier factor de dilución con un medio acuoso (p. ej., agua o tampón) como espécimen. El término "solución no diluida" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a una solución que contiene AT III a una concentración de 50 Unidades/mL, que es una concentración común cuando se utiliza AT III como una preparación inyectable. La "solución no diluida" se puede obtener disolviendo AT III en un medio acuoso, de acuerdo con el método descrito en un prospecto de la preparación inyectable de AT III correspondiente. El término "solución concentrada" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a una solución que contiene AT III a una concentración superior a 50 Unidades/mL. Un ejemplo de "solución concentrada" es un producto purificado intermedio obtenido en una etapa de producción de una preparación inyectable de AT III.

El factor de dilución cuando la solución no diluida se diluye con un medio acuoso no está particularmente limitado, siempre y cuando se pueda detectar una sustancia diana de la prueba de Limulus. Por ejemplo, el factor de dilución es preferiblemente más alto que 1 y más bajo que 64, más preferiblemente más alto que 1 y 16 o más bajo, aún más preferiblemente más alto que 1 y 10 o más bajo, aún más preferiblemente más alto que 1 y 4 o más bajo, particularmente preferiblemente más alto que 1 y 2,5 o más bajo, notablemente preferiblemente de 1,1 a 2,5, particularmente notablemente preferiblemente de 1,2 a 2,5. En particular, el término "factor de dilución" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a la multiplicidad de dilución de una mezcla de reacción en la que se realiza un tratamiento de inactivación de proteínas con presencia conjunta del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria, con respecto a la "solución no diluida" mencionada anteriormente. Por lo tanto, un factor de dilución de "1" se refiere al estado en el que la concentración de AT III de una mezcla de reacción en la que se realiza un tratamiento de inactivación de proteínas con presencia conjunta del agente de pretratamiento de la presente invención es la misma que la concentración de AT III de la "solución no diluida" mencionada anteriormente. En otras palabras, un factor de dilución de "1" se refiere al estado en el que la mezcla de reacción es la misma que la solución no diluida, y también al estado en que la mezcla de reacción no se diluye y, por lo tanto, contiene AT III a una concentración de 50 Unidades/mL.

La AT III también puede ser una proteína recombinante. La AT III recombinante se puede obtener a través de la expresión génica en una célula anfitriona. La expresión en una célula anfitriona se puede realizar a través de un método convencional. Por ejemplo, la expresión en una célula anfitriona se puede realizar a través del método de Yamada. *et al.* (documento WO 2005/035563). La secuencia de aminoácidos de la AT III y la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica AT III se pueden obtener de una base de datos conocida. Los ejemplos de tal base de datos conocida incluyen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La proteína recombinante que se va a expresar puede ser una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica a la de una AT III nativa. Además, la proteína recombinante que se va a expresar puede ser una variante de una AT III nativa, siempre que se mantengan las funciones de la AT III. Tal variante abarca homólogos y productos modificados artificialmente de la AT III conocida.

La "sal de metal divalente" mencionada en la presente memoria no está particularmente limitada siempre que sea una sal metálica reconocida como una sal de metal divalente en la técnica de la presente invención. Los ejemplos de la sal de metal divalente incluyen un fluoruro de metal divalente, un cloruro de metal divalente, un bromuro de metal divalente, un yoduro de metal divalente, un hidróxido de metal divalente, un cianuro de metal divalente, un nitrato de metal divalente, un nitrito de metal divalente, un hipoclorito de metal divalente, un clorito de metal divalente, un clorato de metal divalente, un perclorato de metal divalente, un permanganato de metal divalente, un acetato de metal divalente, un hidrogenocarbonato de metal divalente, un dihidrógeno fosfato de metal divalente, un hidrogenosulfato de metal divalente, una sal hidrogenosulfuro de metal divalente, un tiocianato de metal divalente, un óxido de metal divalente, un sulfuro de metal divalente, un peróxido de metal divalente, un sulfato de metal divalente, un sulfito de metal divalente, un tiosulfato de metal divalente, un carbonato de metal divalente, un cromato de metal divalente, un bicromato de metal divalente, un monohidrógeno fosfato de metal divalente, y un fosfato de metal divalente. En cuanto a la sal de metal divalente, solamente se puede utilizar un único tipo de sal metálica, o se pueden utilizar dos o más tipos combinados de sales metálicas. La sal de metal divalente es preferiblemente, por

ejemplo, una o más sales de metal seleccionadas del grupo que consiste en un cloruro de metal divalente, un acetato de metal divalente y un sulfato de metal divalente.

La sal de metal divalente puede ser una sal de metal que proporciona un ión metálico divalente cuando la AT III está presente junto con el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria. El estado "cuando la AT III está presente junto con el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria" se refiere específicamente a la duración en que se realiza el tratamiento de inactivación de proteínas mencionado a continuación. La sal de metal divalente puede ser, por ejemplo, una sal de metal que proporciona un ión metálico divalente a través de la disolución en un medio acuoso. Los ejemplos del medio acuoso incluyen agua y un tampón.

El "metal divalente" al que se hace referencia en la presente memoria no está particularmente limitado siempre que sea un metal reconocido como metal divalente en la técnica de la presente invención. El "metal divalente" puede hacer referencia a un metal que proporciona un ión metálico divalente cuando se ioniza. Los ejemplos del metal divalente incluyen berilio, magnesio, calcio, estroncio, bario, radio, cadmio, níquel, cinc, cobre, mercurio, hierro, cobalto, estaño, plomo y manganeso. En cuanto al metal divalente, se puede utilizar solamente un único tipo de metal, o se pueden utilizar dos o más tipos de metales combinados. El metal divalente es preferiblemente, por ejemplo, uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en magnesio, calcio, manganeso y cinc.

Los ejemplos específicos de la sal de metal divalente incluyen sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), acetato de magnesio ( $Mg(CH_3CO)_2$ ), cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ), acetato de calcio ( $Ca(CH_3COO)_2$ ), sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ), y sulfato de cinc ( $ZnSO_4$ ). El agente de pretratamiento descrito en la presente memoria puede contener, por ejemplo, solamente sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) como sal de metal divalente. Alternativamente, el agente de pretratamiento puede contener, por ejemplo, sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) y una o más sales de metales divalentes diferentes.

Asimismo, el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria puede contener adicionalmente un componente adicional. El "componente adicional" no está particularmente limitado siempre y cuando sea aceptable para su uso en un reactivo o agente de diagnóstico. Por ejemplo, los componentes que se incorporan a un reactivo o un agente de diagnóstico se pueden emplear como "componente adicional". Los ejemplos del "componente adicional" incluyen un cloruro de metal alcalino, un acetato de metal alcalino, un sulfato de metal alcalino, un tensioactivo y un aditivo. Los ejemplos del aditivo incluyen, pero no se limitan a, un estabilizante, un agente emulsionante, un agente de osmo-regulación, un tampón, un agente tónico, un conservante, un agente de ajuste del pH, un colorante, un excipiente, un agente de condensación, un lubricante, y un disgregante.

La forma del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria no está particularmente limitada. Por ejemplo, el agente de pretratamiento se puede proporcionar en forma de una preparación líquida, o se puede proporcionar en forma de una preparación sólida para su disolución en el uso; por ejemplo se puede emplear en forma de polvo, gránulos, o comprimidos. Además, el agente de pretratamiento se puede proporcionar en forma de una microplaca que retiene el agente de pretratamiento en sus pocillos. Semejante microplaca se puede obtener, por ejemplo, dispensando el agente de pretratamiento que se ha preparado en forma de líquido en los pocillos y secando la placa. En el caso de que el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria se proporcione como una preparación líquida, el agente de pretratamiento se puede proporcionar como un producto congelado, o se puede proporcionar como un producto líquido (estado fundido).

En el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria, la sal de metal divalente puede estar presente en forma de sal, una forma iónica o una mezcla de estas. El estado en el que "el agente de pretratamiento contiene una sal de metal divalente" abarca los tres casos.

Excepto por la incorporación de una sal de metal divalente, el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria se puede producir mediante la misma técnica que se emplea generalmente en la producción de reactivos y agentes de diagnóstico.

La concentración de la sal de metal divalente en el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria no está particularmente limitada, y la concentración puede ajustarse de manera apropiada de acuerdo con diversas condiciones tales como el tipo de sal de metal divalente y la cantidad utilizada del agente de pretratamiento. La concentración de la sal de metal divalente en el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria puede ser, por ejemplo, de 0,001% en masa o superior, 0,01% en masa o superior, 0,1% en masa o superior, 1% en masa o superior, 5% en masa o superior, 10% en masa o superior, 30% en masa o superior, o 50% en masa o superior. La concentración de la sal de metal divalente en el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria puede ser, por ejemplo, de 100% en masa o inferior, 50% en masa o inferior, 30% en masa o inferior, 10% en masa o inferior, 5% en masa o inferior, o 1% en masa o inferior.

La cantidad utilizada del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria no está particularmente limitada, y la cantidad se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con diversas condiciones tales como el tipo y la concentración de la sal de metal divalente. El agente de pretratamiento se puede utilizar para que, por ejemplo, la concentración del ión metálico divalente derivado de la sal de metal divalente (en adelante la concentración puede denominarse "concentración de ión metálico divalente durante el tratamiento") se encuentre dentro de los intervalos

a continuación ejemplificados cuando la AT III está presente junto con el agente de pretratamiento. La "concentración cuando AT III está presente junto con el agente de pretratamiento" se refiere específicamente a la concentración del ión metálico divalente en el sistema de reacción donde se realiza el tratamiento de inactivación de proteínas mencionado a continuación. La concentración de ión metálico divalente durante el tratamiento no está particularmente limitada siempre que se pueda lograr el efecto del pretratamiento descrito en la presente memoria, y la concentración es preferiblemente, por ejemplo, 0,5 mM o superior. La concentración de iones metálicos divalentes durante el tratamiento es, por ejemplo, preferiblemente de 0,5 mM a 100 mM, más preferiblemente de 0,5 mM a 50 mM, aún más preferiblemente de 0,5 mM a 25 mM, aún más preferiblemente de 5 mM a 25 mM, en particular preferiblemente de 5 mM a 12,5 mM. En particular, en el caso en el que el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria contenga dos o más sales de metales divalentes, la "concentración de ión metálico divalente durante el tratamiento" significa la concentración total de los iones metálicos divalentes derivados de estas sales de metales divalentes.

A través de un pretratamiento de AT III mediante el uso del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria, la interferencia de reacción observada cuando la AT III se somete a la prueba de Limulus se puede reducir, y por lo tanto, la prueba de Limulus de AT III se puede llevar a cabo con una gran exactitud.

## (2) El kit

El kit descrito en la presente memoria es un kit de reactivo de Limulus que comprende el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria, como componente. El kit puede comprender adicionalmente un componente adicional. Los ejemplos del "componente adicional" incluyen, pero no se limitan a, un reactivo de Limulus, un sustrato para la detección de la reacción de Limulus, tampón, agua destilada, una sustancia patrón (p. ej., Et o BG) y una microplaca.

El reactivo de Limulus utilizado en la presente memoria no está particularmente limitado siempre que el reactivo contenga una proteína o proteínas involucradas en una reacción en cascada correspondiente a una sustancia diana de la prueba de Limulus. Un ejemplo del reactivo de Limulus son los extractos del corpúsculo sanguíneo del cangrejo herradura (LAL; reactivo de producto lisado). LAL se puede obtener de la sangre de un cangrejo herradura como materia prima a través de un método convencional. LAL se puede utilizar después del fraccionamiento y/o la purificación apropiados. Se puede emplear cualquier tipo de cangrejos herradura como origen de LAL. Los ejemplos de cangrejo herradura incluyen *Tachypleus tridentatus* (Cangrejo herradura japonés), *Limulus polyphemus* (Cangrejo herradura americano), *Carcinoscorpius rotundicauda* (Cangrejo herradura del sudeste asiático), y *Tachypleus gigas* (Cangrejo herradura del sudeste asiático). Los ejemplos del reactivo de Limulus que emplea un producto lisado derivado de *Limulus polyphemus* incluyen Endospecy (marca registrada) ES-50M (producto de Seikagaku Corporation), Pyrochrome (producto de Associates of Cape Cod, Inc.), Pyrotell (marca registrada) -T (producto de Associates of Cape Cod, Inc.), Pyrotell (marca registrada) prueba múltiple (producto Associates of Cape Cod, Inc.), Kinetic-QCL (producto de Lonza Walkersville, Inc.) y Endochrome-K (producto de Charles River Laboratories, Inc.).

Los ejemplos del reactivo de Limulus también incluyen reactivos de Limulus reconstituidos artificialmente. El reactivo de Limulus reconstituido no está particularmente limitado siempre que el reactivo contenga una proteína o proteínas involucradas en una reacción en cascada correspondiente a una sustancia diana de la prueba de Limulus. Las proteínas involucradas en la reacción en cascada también se denominan colectivamente "factores". El término "reacción en cascada" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a una serie de reacciones que se producen debido a la presencia de una sustancia diana de la prueba de Limulus. Por ejemplo, cuando una sustancia que activa el Factor C (p. ej., Et) está presente, se produce una serie de las siguientes reacciones: El Factor C es activado por la sustancia para formar de ese modo el Factor C activado; el factor C activado activa el Factor B para formar de ese modo el Factor B activado; y el Factor B activado activa la Pro-enzima de Coagulación para formar de ese modo la enzima de Coagulación correspondiente. Es decir, en el caso en el que una sustancia que active el Factor C (p. ej., Et) sea una sustancia diana, es suficiente que el reactivo de Limulus reconstituido contenga Factor C, Factor B y Pro-enzima de Coagulación, como factores que constituyen la reacción en cascada. Cuando una sustancia que activa el Factor G (p. ej., BG) está presente, se produce una serie de las siguientes reacciones: El Factor G es activado por la sustancia para formar de ese modo el Factor G activado; y el Factor G activado activa la Pro-enzima de Coagulación para formar de ese modo la enzima de Coagulación correspondiente. Es decir, en el caso en el que una sustancia que active el Factor G (p. ej., BG) sea una sustancia diana, es suficiente que el reactivo de Limulus reconstituido contenga el Factor G y la Pro-enzima de Coagulación, como factores que constituyen la reacción en cascada. El progreso de una reacción en cascada se puede determinar detectando la enzima de Coagulación mediante el uso del sustrato de detección que se menciona a continuación para la reacción del Limulus.

En el caso en el que un sustrato de detección que sea capaz de detectar una fase intermedia de una reacción en cascada se emplee como sustrato de detección mencionado a continuación para la reacción de Limulus, es suficiente que el reactivo de Limulus reconstituido contenga un factor o factores implicados desde el principio de la reacción en cascada a la fase intermedia relevante. Específicamente, por ejemplo, en el caso en el que una sustancia que active el Factor C (p. ej., Et) sea una sustancia diana, y se utilice un sustrato de detección para la reacción del Limulus que sea capaz de detectar el Factor C activado, es suficiente que el reactivo de Limulus reconstituido contenga Factor C.

Cada uno de los factores contenidos en un reactivo de *Limulus* reconstituido puede ser una proteína nativa o una proteína recombinante.

5 Los factores nativos se pueden obtener cada uno a partir de productos lisados de amebocitos (LAL) de los diversos cangrejos herradura mencionados anteriormente. Cada uno de estos factores puede ser purificado hasta un grado deseado antes de su uso. La purificación se puede realizar, por ejemplo, mediante una técnica conocida (Nakamura T. et al., *J. Biochem.* Marzo 1986; 99 (3): 847-57).

10 Los factores también se pueden obtener a través de la expresión en una célula anfitriona. La expresión en una célula anfitriona se puede realizar a través de un método convencional. Por ejemplo, la expresión en una célula anfitriona se puede realizar a través de un método de Mizumura et al., (documento WO 2012/118226). La secuencia de aminoácidos de cada factor y la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el factor se pueden obtener de una base de datos conocida. Los ejemplos de semejante base de datos conocida incluyen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las proteínas recombinantes expresadas de este modo se pueden purificar cada una hasta un grado deseado antes de su uso, según sea necesario.

15 Al combinar adecuadamente los factores, se puede obtener un reactivo de *Limulus* reconstituido. Los factores contenidos en el reactivo de *Limulus* reconstituido pueden ser todos los factores nativos, todas las proteínas recombinantes o cualquier combinación de estos. Además, el reactivo de *Limulus* reconstituido puede ser una combinación apropiada del factor o factores con un LAL completo, o con un LAL que se haya sometido a un fraccionamiento y/o purificación apropiados o similares.

20 El sustrato de detección para la reacción del *Limulus* (en lo sucesivo también puede denominarse simplemente "sustrato de detección") se refiere a un sustrato para detectar el progreso de la reacción en cascada.

25 Los ejemplos del sustrato de detección incluyen coagulógeno. El coagulógeno es un sustrato de detección con respecto a la enzima de Coagulación, que es el producto final de la reacción en cascada. Cuando el coagulógeno entra en contacto con la enzima de Coagulación, se forma un producto coagulado, la coagulina. El progreso de la reacción de coagulación se puede determinar midiendo la turbidez de la mezcla de reacción u observando la formación de gel. El coagulógeno se puede recuperar a partir de extractos de corpúsculos de sangre del cangrejo herradura (LAL). Dado que se ha determinado la secuencia de nucleótidos del gen que codifica el coagulógeno (Miyata et al, *Protein Nucleic acid Enzyme*, edición extra, Núm. 29; pág. 30-43; 1986), el coagulógeno también se puede producir genéticamente de acuerdo con una técnica convencional.

30 El sustrato de detección puede ser un sustrato sintético. El sustrato sintético no está particularmente limitado siempre que tenga una propiedad adecuada para detectar el progreso de la reacción en cascada. La "propiedad adecuada para detectar el progreso de la reacción en cascada" puede ser, por ejemplo, una propiedad para detectar la presencia de enzima de Coagulación o una propiedad para detectar una fase intermedia de la reacción en cascada. Los ejemplos de la "propiedad para detectar la presencia de enzima de Coagulación" incluyen una propiedad de coloración por una reacción enzimática de la enzima de Coagulación y una propiedad de generación de fluorescencia por una reacción enzimática de la enzima de Coagulación. Los ejemplos de la "propiedad para detectar una fase intermedia de la reacción en cascada" incluyen una propiedad de coloración por una reacción enzimática del Factor C activado o similar, y una propiedad de generación de fluorescencia por una reacción enzimática del Factor C activado o similar. Los ejemplos del sustrato sintético incluyen un sustrato representado por la fórmula X-Y-Z (en donde X representa un grupo de protección, Y representa un péptido y Z representa un colorante unido a Y a través del enlace amida). Cuando una sustancia que activa el Factor C (p. ej., Et) está presente en el sistema de reacción que contiene Factor C, Factor B, y la Pro-enzima de Coagulación, se escinde un enlace amida YZ por la reacción enzimática de la enzima de Coagulación, que es producida por la reacción en cascada, para liberar el colorante Z, por lo que se produce coloración o se genera fluorescencia. En el caso en el que se emplee el sistema de reacción que contiene el Factor G y la Pro-enzima de Coagulación, o en el caso en el que se detecte una fase intermedia de la reacción en cascada, es suficiente que el colorante Z sea liberado por la enzima de Coagulación o por una proteína formada producida en la fase intermedia de la reacción en cascada, respectivamente. El grupo protector X no está particularmente limitado, y se puede utilizar adecuadamente un grupo protector conocido para el péptido. Los ejemplos de tal grupo protector incluyen un grupo t-butoxicarbonilo y un grupo benzoilo. El colorante Z no está particularmente limitado, y puede ser un colorante detectable bajo luz visible o puede ser un colorante fluorescente. Los ejemplos del colorante Z incluyen p-nitroanilina (pNA), ácido 7-metoxicumarin-4-acético (MCA), 2,4-dinitroanilina (DNP) y colorantes de Dansilo. Los ejemplos del péptido Y incluyen Leu-Gly-Arg (LGR), Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR) (SEQ ID NO: 1), Val-Pro-Arg (VPR) y Asp-Pro-Arg (DPR). Estos sustratos sintéticos se pueden utilizar cada uno para detectar la presencia de enzima de Coagulación, o para detectar una fase intermedia de la reacción en cascada. Entre estos sustratos sintéticos, se puede seleccionar y utilizar de manera apropiada uno adecuado dependiendo de la diana de detección. Por ejemplo, desde el punto de vista de la especificidad de sustrato, se puede utilizar adecuadamente un sustrato que comprenda LGR como péptido Y para detectar la enzima de Coagulación, y se puede utilizar adecuadamente un sustrato que comprenda VPR o DPR como péptido Y para detectar el Factor C activado. El colorante Z liberado se puede determinar a través de una técnica de acuerdo con la propiedad del colorante.

60 Cuando se utilizan extractos de corpúsculos sanguíneos de cangrejo herradura (LAL) como reactivo de *Limulus*, se

puede utilizar coagulogéno, que está intrínsecamente contenido en LAL, como un sustrato de detección. Además, se puede utilizar un sustrato de detección adecuadamente seleccionado combinado con LAL.

Cuando se utiliza un reactivo de Limulus reconstituido como reactivo de Limulus, se puede combinar un sustrato de detección seleccionado apropiadamente con el reactivo de Limulus reconstituido.

- 5 En el kit descrito en la presente memoria, estos factores y sustratos de detección pueden estar presentes como una mezcla de estos, como componentes separados, o como combinaciones arbitrarias separadas de estos.

Mediante el pretratamiento de AT III con el kit descrito en la presente memoria, la interferencia de reacción observada cuando AT III se somete a la prueba de Limulus se puede reducir, por lo que la prueba de Limulus de AT III se puede llevar a cabo con gran precisión.

10 (3) El método de pretratamiento

El método de pretratamiento descrito en la presente memoria es un método para tratar preliminarmente la AT III que se va a someter a una prueba de Limulus, cuyo método que comprende someter AT III a un tratamiento de inactivación de proteínas con presencia conjunta del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria.

- 15 El "tratamiento de inactivación de proteínas" al que se hace referencia en la presente memoria no está particularmente limitado siempre que sea un tratamiento de inactivación de AT III, o más específicamente un tratamiento de inactivación de AT III en un grado tal que no se inhiba la prueba de Limulus. Los ejemplos del tratamiento de inactivación de proteínas incluyen, pero no se limitan a, un tratamiento térmico, un tratamiento con ácido y un tratamiento alcalino. Como tratamiento de inactivación de proteínas, solo se puede utilizar un único tipo de tratamiento, o se pueden utilizar dos o más tipos de tratamientos combinados.

- 20 El tratamiento de inactivación de proteínas se puede realizar, por ejemplo, en un medio acuoso tal como agua o un tampón. Es decir, el tratamiento de inactivación de proteínas se puede realizar, por ejemplo, en un medio acuoso que contiene AT III en presencia conjunta del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria.

- 25 El término "tratamiento térmico" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere al calentamiento de AT III con presencia conjunta del agente de pretratamiento descrito en la presente memoria. El método de calentamiento no está particularmente limitado, y se emplea preferiblemente un método que utiliza un aparato de calentamiento tal como un bloque térmico, un baño de agua, un baño de aire o un horno microondas. La temperatura del tratamiento térmico no está particularmente limitada siempre que se produzca la inactivación de las proteínas. Por ejemplo, la temperatura del tratamiento térmico es generalmente superior a 50°C. La temperatura del tratamiento térmico es preferiblemente, por ejemplo, de 55°C a 100°C, más preferiblemente de 55°C a 95°C, aún más preferiblemente de 60°C a 90°C, todavía más preferiblemente de 65°C a 85°C, particularmente preferiblemente de 65°C a 75°C. El tiempo del tratamiento térmico no está particularmente limitado siempre que se produzca la inactivación de las proteínas. Por ejemplo, el tiempo del tratamiento térmico es preferiblemente de 1 minuto o más. El tiempo del tratamiento térmico es, por ejemplo, preferiblemente de 1 minuto a 2 horas, más preferiblemente de 1 minuto a 1 hora, aún más preferiblemente de 5 minutos a 30 minutos, todavía más preferiblemente de 5 minutos a 20 minutos, particularmente preferiblemente de 5 minutos a 15 minutos.

- 35 El término "tratamiento con ácido" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a un tratamiento para poner la AT III presente junto con el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria en contacto con un ácido. Los ejemplos del ácido utilizado en el tratamiento con ácido incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico. De estos, se prefiere el ácido clorhídrico. La cantidad de ácido agregado se puede ajustar adecuadamente de acuerdo con diversas condiciones, tales como el tipo de ácido. La cantidad de ácido agregado puede ser, por ejemplo, una cantidad tal que la concentración de ácido del sistema de reacción en el tratamiento con ácido sea de 0,001 N a 1 N, preferiblemente de 0,01 N a 0,5 N, más preferiblemente de 0,01 N a 0,1 N. El tiempo del tratamiento con ácido no está particularmente limitado siempre que se produzca la inactivación de las proteínas, y puede ser un tiempo generalmente empleado en un tratamiento con ácido. El tiempo de tratamiento con ácido puede ser, por ejemplo, de 0,1 segundos a 2 horas.

- 45 El término "tratamiento alcalino" al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a un tratamiento para poner en contacto la AT III presente junto con el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria con un álcali. Los ejemplos del álcali utilizados en el tratamiento con álcali incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. De estos, se prefiere el hidróxido de sodio. La cantidad de álcali añadido puede ajustarse adecuadamente de acuerdo con diversas condiciones, tales como el tipo de álcali. La cantidad de álcali añadido puede ser, por ejemplo, una cantidad tal que la concentración de álcali del sistema de reacción en el tratamiento con álcali sea de 0,001 N a 1 N, preferiblemente de 0,01 N a 0,5 N, más preferiblemente de 0,01 N a 0,1 N. El tiempo del tratamiento con álcali no está particularmente limitado siempre que se produzca la inactivación de proteínas, y puede ser un tiempo generalmente empleado en un tratamiento con álcali. El tiempo de tratamiento con álcali puede ser, por ejemplo, de 0,1 segundos a 2 horas.

El método de pretratamiento descrito en la presente memoria puede incluir adicionalmente una etapa diferente del tratamiento de inactivación de proteínas.

Por ejemplo, un tratamiento adicional se puede realizar apropiadamente en AT III antes del tratamiento de inactivación de proteínas. Por ejemplo, se puede realizar un tratamiento de procesamiento de AT III, tal como la reducción del tamaño de partícula del polvo seco de AT III. Además, la AT III puede estar diluida o concentrada. Estos tratamientos adicionales pueden realizarse cada uno antes de que la AT III esté presente junto con el agente de pretratamiento descrito en la presente memoria, o después de que la AT III esté presente junto con el agente de pretratamiento y antes del tratamiento de inactivación de proteínas.

Además, después del tratamiento de inactivación de proteínas, se puede realizar apropiadamente un tratamiento posterior. El tratamiento posterior puede ser, por ejemplo, un tratamiento para prevenir la inhibición de la prueba de Limulus cuando la AT III tratada preliminarmente se somete a una prueba de Limulus. Por ejemplo, cuando se ha realizado un tratamiento térmico como un tratamiento de inactivación de proteínas, el producto tratado de este modo se puede enfriar. Además, por ejemplo, cuando el tratamiento con ácido se realiza como un tratamiento de inactivación de proteínas, el producto tratado de este modo se puede neutralizar con álcali. Además, por ejemplo, cuando se realiza un tratamiento con álcali como tratamiento de inactivación de proteínas, el producto tratado de este modo se puede neutralizar con ácido. Además, por ejemplo, tal producto tratado puede estar diluido o concentrado.

A través del pretratamiento de AT III por el método de pretratamiento descrito en la presente memoria, se puede reducir la interferencia de reacción observada cuando AT III se somete a la prueba de Limulus, por lo que la prueba de Limulus de AT III se puede realizar con gran precisión.

#### (4) Método de ensayo

El método de ensayo descrito en la presente memoria es un método para medir una sustancia diana de la prueba de Limulus contenida en AT III, comprendiendo el método tratar preliminarmente la AT III a través del método de pretratamiento, y someter la AT III tratada de manera preliminar a la prueba de Limulus.

La prueba de Limulus se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una técnica conocida. Los ejemplos de semejante técnica conocida incluyen el ensayo cromogénico, el ensayo turbidimétrico y el ensayo de coagulación en gel.

Específicamente, la prueba de Limulus se puede llevar a cabo poniendo AT III en contacto con un reactivo de Limulus. Cuando una sustancia diana de la prueba de Limulus está presente en AT III, se produce una reacción en cascada. Por lo tanto, la sustancia diana de la prueba de Limulus en AT III se puede medir determinando el progreso de la reacción en cascada. En la prueba de Limulus, los factores pueden estar contenidos en el sistema de reacción al comienzo de la etapa de poner AT III en contacto con el reactivo de Limulus, o se pueden añadir sucesivamente al sistema de reacción.

El progreso de la reacción en cascada se puede determinar mediante el uso de un sustrato de detección. Es decir, el progreso de la reacción en cascada se puede determinar midiendo la respuesta (coloración, coagulación, etc.) del sustrato de detección según el tipo de sustrato de detección. El sustrato de detección se puede añadir al sistema de reacción en cualquier momento. Por ejemplo, el sustrato de detección puede estar contenido en el sistema de reacción al comienzo de la etapa de poner AT III en contacto con un reactivo de Limulus, o se puede añadir durante o después de la etapa. En el caso en el que se utiliza un reactivo de Limulus que contenga un sustrato de detección, no es necesario añadir un sustrato de detección adicional al sistema de reacción.

El método de ensayo descrito en la presente memoria puede comprender adicionalmente cualquier etapa adicional, siempre que se produzca una reacción en cascada cuando AT III contiene una sustancia diana de la prueba de Limulus. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, el método de ensayo descrito en la presente memoria puede comprender adicionalmente una etapa de adición de un sustrato de detección al sistema de reacción. Además, el método de ensayo puede comprender adicionalmente una etapa de transformación de los datos obtenidos a través de la medición en datos diferentes. Un ejemplo de la etapa de transformación de los datos obtenidos a través de la medición en datos diferentes es la etapa de cálculo de la cantidad de una sustancia diana de la prueba de Limulus presente en AT III basándose en los datos obtenidos a través de la medición.

En el método de ensayo descrito en la presente memoria, cualquier reacción se realiza preferiblemente en un medio acuoso tal como agua o un tampón.

De acuerdo con el método de ensayo descrito en la presente memoria, la interferencia de reacción observada cuando AT III se somete a la prueba de Limulus se puede reducir, por lo que la prueba de Limulus de AT III se puede llevar a cabo con gran precisión.

Por lo tanto, se puede obtener AT III que se ha confirmado que está libre de contaminación de una sustancia diana de la prueba de Limulus. Es decir, también se describe en la presente memoria un método para producir AT III, comprendiendo el método la medición de una sustancia diana de la prueba de Limulus en AT III a través del método de ensayo descrito en la presente memoria. La AT III producida de este modo se puede proporcionar en cualquier forma, tal como una preparación inyectable.

## Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación más específicamente a modo de ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes del alcance técnico de la presente invención. En particular, se aseguró que el agua, los reactivos, los artículos de plástico, los artículos de vidrio y otros utilizados en todas las pruebas descritas en los Ejemplos no contuvieran endotoxinas ni ningún factor de interferencia en la reacción con respecto a la reacción de un reactivo de Limulus.

### <Definición de recuperación de Et>

En las pruebas llevadas a cabo a través de un ensayo cromogénico o un ensayo turbidimétrico, se calculó la recuperación media de Et añadida (recuperación de Et) mediante el siguiente procedimiento. Específicamente, al igual que la prueba de Limulus para un espécimen de AT III enriquecido con una cantidad conocida de Et, la prueba de Limulus para un espécimen que emplea un volumen equivalente de agua en lugar de AT III y enriquecido con Et de la misma manera se llevó a cabo simultáneamente como control positivo. La tasa de cambio de absorbancia (mAbs/min) del espécimen de AT III se dividió por la tasa de cambio de absorbancia del control positivo, y el valor así obtenido se convirtió en un porcentaje, para obtener de ese modo la recuperación de Et. En el caso de que la AT III o el agua estén contaminadas con Et, la recuperación de Et se puede calcular después de restar un valor equivalente de contaminación de una medición correspondiente. Es decir, el concepto "recuperación de Et" puede hacer referencia a la razón (%) de la cantidad de Et realmente detectada en un espécimen de AT III con respecto a la cantidad de Et que se detectará teóricamente en el caso en el que la interferencia de la reacción por AT III esté ausente.

### <Ejemplo de referencia 1>

Prueba de recuperación de Et para AT III, investigada a través del método de dilución y calentamiento

Se proporcionaron una preparación de 50 unidades/mL de AT III sin diluir (Neuart (marca registrada; producto de Benesis; en lo sucesivo, se aplicará lo mismo) y sus preparaciones diluidas en agua a factores de dilución de 4, 16, 64 y 256. A cada una de las preparaciones sin diluir y diluidas (0,4 mL), se le añadió una solución patrón (0,04 mL) de Et (JPRSE: muestra patrón de endotoxinas de la Farmacopea Japonesa; en lo sucesivo, se aplicará lo mismo) preparada a una concentración de 0,5 UE/mL. Las mezclas preparadas de este modo se agitaron vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, cada solución (0,2 mL) se dispensó en otro recipiente y se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico. Después de eso, la solución así calentada (0,05 mL) se dispensó en una microplaca y se añadió a la microplaca un reactivo de ensayo de Et para el ensayo cromogénico (Endospecy (marca registrada) ES-50M; producto de Seikagaku Corporation); en lo sucesivo, se aplicará lo mismo) (0,05 mL). La microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos provisto de funciones de baño termostático y agitación (Lector de pocillos MP-96; producto de Seikagaku Corporation; en lo sucesivo, se aplicará lo mismo). Posteriormente, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras que la microplaca se calentó a 37°C durante 30 minutos, y a continuación se calculó la recuperación de Et. La tabla 1 muestra los resultados.

[Tabla 1]

Factor de dilución	Recuperación de Et
× 1	7,3 %
× 4	5,8 %
× 16	9,4 %
× 64	120,0 %
× 256	100,3 %

Como se muestra en la Tabla 1, cuando el factor de dilución fue 16 o menor, la recuperación de Et fue inferior a 10%, y no se pudo detectar Et con alta precisión. Por el contrario, cuando el factor de dilución fue 64 o más alto, se logró una recuperación de Et de aproximadamente 100%. Los resultados fueron prácticamente los mismos que los resultados referidos anteriormente del método de calentamiento por dilución (Documento no de patente 1).

## &lt;Ejemplo 1&gt;

Ensayo de recuperación de Et, en donde se realizó un tratamiento térmico en presencia de sulfato de magnesio o cloruro de calcio

5 Se añadió una solución patrón de 0,5 UE/mL de Et (0,1 mL) a una preparación de 25 Unidades/mL de AT III (preparación de AT III diluida dos veces con agua) (0,9 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Con posterioridad, la mezcla (0,18 mL) se dispensó en otro recipiente y se añadió MgSO<sub>4</sub> acuoso 15,6 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM o 1.000 mM (0,02 mL), o CaCl<sub>2</sub> acuoso 15,6 mM, 56 mM, 125 mM, 250 mM o 500 mM (0,02 mL), seguido de agitación vigorosa durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Cada solución se calentó durante 10 minutos a 70°C por medio de un bloque térmico, y la solución se enfrió inmediatamente con hielo. La solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispuso una alícuota (0,05 mL) de la misma en una microplaca. Se añadió Endospecy ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después de eso, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos, y a 15 continuación se calculó la recuperación de Et. Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados. En las tablas, "Concentración de MgSO<sub>4</sub>" y "Concentración de CaCl<sub>2</sub>" son las de cada mezcla de reacción durante el tratamiento térmico. El factor de dilución de la preparación de AT III empleada en el Ejemplo 1 fue de aproximadamente 2,5.

[Tabla 2]

Tabla 2: Resultados de la detección de Et en el caso de tratamiento térmico con presencia conjunta de sulfato de magnesio	
Concentración de MgSO <sub>4</sub>	Recuperación de Et
1,56 mM	0,0 %
12,5 mM	95,0 %
25 mM	108,0 %
50 mM	99,9 %
100 mM	93,7 %

20 [Tabla 3]

Tabla 3: Resultados de la detección de Et en el caso de tratamiento térmico en presencia conjunta de cloruro de calcio,	
Concentración CaCl <sub>2</sub>	Recuperación de Et
1,56 mM	6,4 %
5,6 mM	75,0 %
12,5 mM	52,4 %
25 mM	48,0 %
50 mM	13,1 %

25 Como se muestra en las Tablas 2 y 3, en contraste con el caso del método de dilución y calentamiento, cuando AT III y Et se sometieron a un tratamiento térmico con presencia conjunta de sulfato de magnesio o cloruro de calcio, se pudo detectar Et con una gran precisión, sin diluir a un factor de dilución de 64 o más. Particularmente, cuando la concentración de sulfato de magnesio fue 12,5 mM o mayor, se pudo detectar Et con una alta precisión.

## &lt;Ejemplo 2&gt;

Investigación del tipo de sales de metales divalentes

Se añadió una solución patrón de 0,5 UE/mL de Et (0,22 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,2

mL) y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Con posterioridad, se añadió agua (1,8 mL) a esto y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,1 mL) de la mezcla en otro recipiente. Se añadió una solución acuosa 50 mM o 5 mM de una sal de metal divalente en una cantidad de 1/10 (0,011 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Cada solución se calentó durante 10 minutos a 70°C por medio de un bloque térmico, y la solución se enfrió inmediatamente con hielo. La solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,05 mL) de la misma en una microplaca. Se añadió Endospeck ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después de eso, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos, y a continuación se calculó la recuperación de Et. La tabla 4 muestra los resultados. En la tabla, la concentración de sal de metal divalente es la de la mezcla de reacción durante el tratamiento térmico. El factor de dilución de la preparación de AT III empleada en el Ejemplo 2 fue de aproximadamente 12.

[Tabla 4]

Tabla 4: Resultados de la detección de Et en el caso de tratamiento térmico con presencia conjunta de una sal de metal divalente	
Sal de metal divalente presente conjuntamente	Recuperación de Et
0,5 Mg Mg(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub>	56,8 %
5,0 Mg Mg(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub>	104,7 %
0,5 MgCl mM <sub>2</sub>	11,1 %
5,0 MgCl mM <sub>2</sub>	106,2 %
0,5 mM Ca(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub>	75,7 %
5,0 mM Ca(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub>	84,6 %
0,5 mM MnSO <sub>4</sub>	110,7 %
5,0 mM MnSO <sub>4</sub>	88,1 %
0,5 mM ZnSO <sub>4</sub>	105,7 %
5,0 mM ZnSO <sub>4</sub>	15,7 %

Como se muestra en la Tabla 4, se pudo detectar Et en el caso en el que AT III se sometió a un tratamiento térmico con presencia conjunta de Mg(CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Ca(CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, o ZnSO<sub>4</sub>.

<Ejemplo 3>

Investigación de temperatura y tiempo del tratamiento térmico.

Se añadió una solución patrón de 0,5 UE/mL de Et (0,1 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,9 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Con posterioridad, una alícuota (0,18 mL) de la mezcla se dispensó en otro recipiente. Posteriormente, se añadió a esto CaCl<sub>2</sub> acuoso 200 mM (0,02 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Cada solución se colocó sobre hielo o se calentó a 37°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C o 90°C durante 5 minutos, 10 minutos o 20 minutos por medio de un bloque térmico. En caso de calentamiento, la solución se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. Cada solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,05 mL) de la misma en una microplaca. Se añadió Endospeck ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después de eso, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos, y a continuación se calculó la recuperación de Et. La Tabla 5 muestra los resultados. La concentración de CaCl<sub>2</sub> de la mezcla de reacción durante el tratamiento térmico fue 20 mM. El factor de dilución de la preparación de AT III empleada en el Ejemplo 3 fue de aproximadamente 1,2.

[Tabla 5]

Tabla 5: Resultados de la detección de Et en el caso de tratamiento térmico en diversas condiciones			
	Temperatura	Hora	Recuperación de Et
	0°C	10 min.	0,0 %
	37°C	5 min.	0,0 %
		10 min.	0,0 %
	50°C	10 min.	0,0 %
	60°C	5 min.	35,7 %
		10 min.	46,3 %
		5 min.	52,3 %
	70°C	10 min.	61,9 %
		20 min.	68,6 %
	80°C	10 min.	57,9 %
	90°C	10 min.	56,5 %

5 Como se muestra en la Tabla 5, cuando el tratamiento térmico se realizó a 60°C o más, se pudo detectar Et. Además, cuando el tratamiento térmico se realizó durante 5 minutos o más, se pudo detectar Et. Basándose en los resultados obtenidos para el calentamiento a la temperatura sometida a prueba (60°C, 70°C, 80°C o 90°C) durante 10 minutos, se pensó que se prefería una temperatura de tratamiento térmico de 70°C, a la que se obtuvo la mayor recuperación de Et.

<Ejemplo de referencia 2>

Investigación del efecto de la adición de sal de metal divalente después del tratamiento térmico

10 Se añadió una solución patrón de 0,5 UE/mL de Et (0,1 mL) a agua (0,9 mL) o a una preparación de 50 unidades/mL de AT III diluida en agua 4 veces o 16 veces (0,9 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se dispensó una alícuota (0,18 mL) de la mezcla en otro recipiente, y cada mezcla se colocó sobre hielo o se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico. En el caso de calentamiento, la solución se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. Cada solución se hizo volver a la temperatura ambiente. Después de eso, se añadieron a esto agua o CaCl<sub>2</sub> acuoso 7 mM, 28 mM o 112 mM (0,02 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,05 mL) de la misma en una microplaca. Se añadió Endospecy ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después de eso, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos, y a continuación se calculó la recuperación de Et. La Tabla 6 muestra los resultados.

[Tabla 6]

Tabla 6: Resultados de la detección de Et en el caso de la adición de sal de metal divalente después del tratamiento térmico			
	Factor de dilución	Concentración de CaCl <sub>2</sub>	Recuperación de Et
	x 4	0 mM	8,0 %
		0,7 mM	6,9 %
		2,8 mM	6,3 %
		11,2 mM	5,9 %

Tabla 6: Resultados de la detección de Et en el caso de la adición de sal de metal divalente después del tratamiento térmico

	Factor de dilución	Concentración de CaCl <sub>2</sub>	Recuperación de Et
	× 16	0 mM	9,6 %
		0,7 mM	6,0 %
		2,8 mM	5,7 %
		11,2 mM	5,5 %

Como se muestra en la Tabla 6, en el método que emplea la adición de una sal de metal divalente después del tratamiento térmico, la recuperación de Et fue inferior a 10%, no detectando Et con una alta precisión. Por lo tanto, se averiguó que la sal de metal divalente debe estar presente junto con AT III y Et antes del tratamiento térmico.

## 5 &lt;Ejemplo 4&gt;

Investigación del tratamiento del ácido.

Se añadió una solución patrón de 0,5 UE/mL de Et (0,22 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,2 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (1,8 mL) a esto y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se dispensó una alícuota (0,1 mL) de la mezcla en otro recipiente. Se añadió una solución acuosa 50 mM o 5 mM de una sal de metal divalente en una cantidad de 1/10 (0,011 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Después de eso, se le añadió HCl 5N, 2N, 1N, 0,5N o 0,1N (0,011 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,05 mL) de la misma en una microplaca. Se añadió Endospecy ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos, por medio de lo cual se calculó la recuperación de Et. La Tabla 7 muestra los resultados. En la Tabla 7, la concentración de sal de metal divalente y la concentración de ácido clorhídrico son las de las mezclas de reacción durante el tratamiento con ácido (valores estimados). El factor de dilución de la preparación de AT III empleado en el Ejemplo 4 fue de aproximadamente 14.

[Tabla 7]

Tabla 7: Resultados de la detección de Et en el caso de tratamiento con ácido con presencia conjunta de una sal de metal divalente

	Sal de metal divalente presente conjuntamente	Concentración de HCl	Recuperación de Et
		0,01 N	37,5 %
		0,05 N	66,9 %
	ZnSO <sub>4</sub> 0,5 mM	0,1 N	30,3 %
		0,2 N	7,9 %
		0,5 N	2,9 %
		0,01 N	11,6 %
		0,05 N	51,0 %
	Ca(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> 5 mM	0,1 N	54,6 %
		0,2 N	6,9 %
		0,5 N	3,3 %
		0,01 N	14,0 %

Tabla 7: Resultados de la detección de Et en el caso de tratamiento con ácido con presencia conjunta de una sal de metal divalente

Sal de metal divalente presente conjuntamente	Concentración de HCl	Recuperación de Et
	0,05 N	51,8 %
CaCl <sub>2</sub> 5 mM	0,1 N	50,2 %
	0,2 N	4,8 %
	0,5 N	2,9 %
	0,01 N	9,7 %
	0,05 N	54,9 %
Mg(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> 5 mM	0,1 N	69,0 %
	0,2 N	Sin datos
	0,5 N	4,0 %
	0,01 N	36,8 %
	0,05 N	59,1 %
MgSO <sub>4</sub> 5 mM	0,1 N	64,3 %
	0,2 N	4,9 %
	0,5 N	4,0 %
	0,01 N	34,8 %
	0,05 N	48,2 %
MnSO <sub>4</sub> 5 mM	0,1 N	48,7 %
	0,2 N	Sin datos
	0,5 N	2,9 %

Como se muestra en la Tabla 7, a través del tratamiento con ácido en presencia conjunta de un metal divalente, se pudo detectar Et, de manera similar al caso del tratamiento térmico. En particular, cuando la concentración de ácido clorhídrico es de 0,01 N a 0,1 N, se puede detectar Et eficazmente.

##### 5 <Ejemplo 5>

Prueba que emplea Pyrochrome (reactivo de ensayo Et para ensayo cromogénico)

Se añadió una solución patrón de 0,4 UE/mL de Et (0,1 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,1 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (0,1 mL) a esto, y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> 25 mM (0,1 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,2 mL) de la mezcla en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 4 veces. A la porción restante (0,2 mL) de la mezcla, se le añadió agua (0,2 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,2 mL) de la mezcla diluida obtenida de este modo en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 8 veces. Se repitió la operación, para preparar de este modo una solución de AT III diluida 16 veces y una solución diluida 32 veces, y cada solución diluida se dispensó en otro recipiente. Cada una de las soluciones obtenidas de este modo se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico, y después se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. Cada solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,05 mL) de la misma en una microplaca. Se añadió un reactivo de ensayo de Et para el ensayo cromogénico (Pyrochrome; producto de Associates of Cape Cod, Inc.) (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después de eso, se controló el cambio

con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 60 minutos, y después se calculó la recuperación de Et. La Tabla 8 muestra los resultados.

[Tabla 8]

Factor de dilución	Recuperación de Et
× 4	93,9 %
× 8	96,2 %
× 16	104,5 %
× 32	104,8 %

5

Como se muestra en la Tabla 8, incluso cuando se utilizó Pyrochrome como reactivo de ensayo de Et para el ensayo cromogénico en lugar de Endospecy ES-50 M, se podía lograr una recuperación de Et de aproximadamente 100% independientemente del factor de dilución para la preparación de AT III, es decir, la Et se pudo detectar con gran precisión. Por lo tanto, se averiguó que, incluso cuando se utilizaba Pyrochrome como reactivo de ensayo de Et para el ensayo cromogénico, la Et presente juntamente con AT III podía medirse con gran precisión mediante la realización del método de pretratamiento descrito en la presente memoria.

10

<Ejemplo 6>

Prueba que emplea Pyrotell-T (reactivo de ensayo de Et para ensayo turbidimétrico)

15

Se añadió una solución patrón de 0,4 UE/mL de Et (0,1 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,1 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (0,1 mL), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> 25 mM (0,1 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,2 mL) de la mezcla en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 4 veces. A la porción restante (0,2 mL) de la mezcla, se le añadió agua (0,2 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,2 mL) de la mezcla diluida obtenida de este modo en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 8 veces. Se repitió la operación, para preparar de este modo una solución de AT III diluida 16 veces y una solución diluida 32 veces, y cada solución diluida se dispensó en otro recipiente. Cada una de las soluciones obtenidas de este modo se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico, y después se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. Cada solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,1 mL) en una microplaca. Se añadió un reactivo de ensayo de Et para el ensayo turbidimétrico (Pyrotell (marca registrada) -T; producto de Associates of Cape Cod, Inc.) (0,1 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Con posterioridad, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 660 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 60 minutos, y después se calculó la recuperación de Et. La Tabla 9 muestra los resultados.

20

25

30

[Tabla 9]

Factor de dilución	Recuperación de Et
× 4	99,0 %
× 8	86,2 %
× 16	80,1 %
× 32	85,5 %

35

Como se muestra en la Tabla 9, incluso cuando se utilizó Pyrotell-T como reactivo de ensayo de Et en lugar de

Endospecy ES-50 M, se podía lograr una recuperación de Et de aproximadamente 100% independientemente del factor de dilución para la preparación de AT III, es decir, la Et podrá ser detectada con gran precisión. Por lo tanto, se averiguó que, incluso cuando se utilizaba un reactivo de ensayo de Et para el ensayo turbidimétrico en forma de un reactivo de Limulus, la Et presente juntamente con AT III podía medirse con gran precisión mediante la realización del método de pretratamiento de la presente invención.

<Ejemplo 7>

Prueba que emplea la prueba múltiple Pyrotell (reactivo de ensayo de Et para ensayo de coagulación en gel)

Se añadió una solución patrón de 0,24 UE/mL de Et (0,1 mL) a una preparación de 50 unidades/mL de AT III (0,1 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (0,1 mL), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> 25 mM (0,1 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,2 mL) de la mezcla en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 4 veces. A la porción restante (0,2 mL) de la mezcla, se le añadió agua (0,2 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,2 mL) de la mezcla diluida obtenida de este modo en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 8 veces. Se repitió la operación, para preparar de este modo una solución de AT III diluida 16 veces y una solución diluida 32 veces, y cada solución diluida se dispensó en otro recipiente. Cada una de las soluciones obtenidas de este modo se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico, y después se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. Cada solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,1 mL) en un tubo de ensayo de fondo redondo. Se añadió al tubo de ensayo un reactivo de ensayo de Et para el ensayo de coagulación en gel (prueba múltiple Pyrotell (marca registrada); producto de Associates of Cape Cod, Inc.) (0,1 mL), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo, seguido de calentamiento a 37°C durante una hora por medio de un bloque térmico. Después de eso, el tubo de ensayo se inclinó lentamente, y se comprobó la formación de gel sólido del contenido ya que el gel no fluía. La Tabla 10 muestra los resultados.

[Tabla 10]

Factor de dilución	Concentración de Et	Evaluación
× 4	0,06 UE/mL	+ (positivo)
× 8	0,03 UE/mL	+ (positivo)
× 16	0,015 UE/mL	- (negativo)
× 32	0,0075 UE/mL	- (negativo)

Como se muestra en la Tabla 10, el coágulo de gel del contenido se observó en una solución de AT III que contenía Et a una concentración de 0,03 UE/mL, que es el límite de detección para la multi-prueba Pyrotell, o superior. Por lo tanto, se averiguó que, incluso cuando se utilizaba un reactivo de ensayo de Et para un ensayo de coagulación en gel como reactivo de Limulus, se pudo detectar la Et presente juntamente con AT III con gran precisión al llevar a cabo el método de pretratamiento descrito en la presente memoria.

<Ejemplo 8>

Prueba que emplea el ensayo de líneas paralelas (1)

Se añadió una solución patrón de 1 UE/mL de Et (0,11 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,475 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (0,475 mL), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de MgSO<sub>4</sub> 500 mM (0,05 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. La solución obtenida de este modo se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico, y a continuación se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. La solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,5 mL) en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida dos veces. A la porción restante (0,5 mL) de la mezcla, se le añadió agua (0,5 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (0,5 mL) de la mezcla diluida obtenida de este modo en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 4 veces. Se repitió la operación, para preparar así una solución de AT III diluida 8 veces, una solución diluida 16 veces y una

5

solución diluida 32 veces, y cada solución diluida se dispensó en otro recipiente. Por separado, se utilizó agua para la prueba de endotoxina en lugar de una preparación de AT III para preparar y proporcionar una serie de dilución similar sin el pretratamiento descrito en la presente memoria como especímenes de control. Cada solución (0,05 mL) se dispensó en una microplaca. Se añadió Endospecy ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Posteriormente, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos. La Tabla 11 y la Fig. 1 muestran los resultados.

[Tabla 11]

Tabla 11: Resultados de la prueba que emplea el ensayo de líneas paralelas					
(1) Resultados de la medición del agua de la prueba de Et como espécimen					
Concentración de Et		Tasa de cambio de absorbancia (mAbs/min)			
UE/mL	valor log	M1	M2	M3	Promedio (valor log)
0,00619	-2,208	0,880	0,880	0,930	-0,048
0,01238	-1,907	1,540	1,600	1,540	0,193
0,02475	-1,606	2,970	2,970	2,970	0,473
0,04950	-1,305	6,170	5,230	5,280	0,744
0,09900	-1,004	10,150	10,120	10,110	1,005
* M1, M2 y M3: Medida 1, 2 y 3					
(2) Resultados de la medición de la preparación de AT III como espécimen					
Razón de dilución		Tasa de cambio de absorbancia (mAbs/min)			
	valor log	M1	M2	M3	Promedio (valor log)
0,02675	-1,573	1,020	1,020	1,020	0,009
0,05350	-1,272	1,750	1,760	1,930	0,258
0,10700	-0,971	3,360	3,280	3,230	0,517
0,21400	-0,670	6,520	6,650	6,650	0,820
0,42800	-0,369	12,090	13,320	12,670	1,103
* M1, M2 y M3: Medida 1, 2 y 3					

10

15

20

Como se muestra en la Fig. 1, las tasas de cambio de absorbancia medidas de los especímenes que contenían AT III se trazaron log-log con respecto a los factores de dilución, y las tasas de cambio de absorbancia medidas de los especímenes de control (series de dilución a la mitad de la solución patrón de endotoxina con agua para la prueba de endotoxina) se trazaron log-log con respecto a las concentraciones de endotoxina. Las dos líneas trazadas de este modo se sometieron a prueba en términos de paralelismo a través de un ensayo de líneas paralelas. El ensayo se realizó a través de un análisis estadístico mediante el uso de un soporte lógico especializado para el ensayo de líneas paralelas (PL603; producto de Seikagaku Corporation). Como resultado, se estableció la linealidad de regresión en cada línea y se estableció un paralelismo entre las dos líneas. Por lo tanto, los resultados de la prueba fueron satisfactorios. La recuperación de Et, calculada dividiendo la concentración de Et (0,275 UE/mL) calculada a través del ensayo de líneas paralelas por la concentración de Et de control (0,232 UE/mL), fue de 118,5%.

<Ejemplo 9>

Prueba que emplea el ensayo de líneas paralelas (2)

5 Se añadió una solución patrón de 1 UE/mL de Et (0,1 mL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (0,8 mL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (0,02 mL), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se le añadió a esto una solución acuosa de MgSO<sub>4</sub> 500 mM (0,08 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. La solución obtenida de este modo se calentó a 70°C durante 10 minutos por medio de un bloque térmico, y después se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. La solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (0,5 mL) en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 1,25 veces. A la porción restante (0,5 mL) de la mezcla, se le añadió MgSO<sub>4</sub> acuoso 40 mM (0,5 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Una alícuota (0,5 mL) de la mezcla diluida obtenida de este modo se dispensó en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 2,5 veces. Se repitió la operación, para preparar así una solución de AT III diluida 5 veces, una solución diluida 10 veces y una solución diluida 20 veces, y cada solución diluida se dispensó en otro recipiente. Por separado, se utilizó agua para la prueba de endotoxina en lugar de una preparación de AT III para preparar y proporcionar una serie de dilución similar sin el pretratamiento descrito en la presente memoria como especímenes de control. Cada solución (0,05 mL) se dispensó en una microplaca. Se añadió Endospecy ES-50 M (0,05 mL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Posteriormente, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos. La Tabla 12 y la Figura 2 muestran los resultados.

[Tabla 12]

(1) Resultados de la medición del agua de la prueba de Et como espécimen				
Concentración de Et		Tasa de cambio en la absorbancia (mAbs/min)		
UE/mL	valor log	M1	M2	Promedio (valor log)
0,00625	-2,204	0,890	0,950	-0,036
0,01250	-1,903	1,660	1,430	0,188
0,02500	-1,602	3,270	3,190	0,509
0,05000	-1,301	5,950	6,050	0,778
0,10000	-1,000	11,460	11,710	1,064
* M1 y M2: Medida 1 y 2				
(2) Resultados de la medición de la preparación de AT III como espécimen				
Razón de dilución		Tasa de cambio en la absorbancia (mAbs/min)		
	valor log	M1	M2	Promedio (valor log)
0,05000	-1,301	0,930	0,910	-0,036
0,10000	-1,000	1,690	1,690	0,228
0,20000	-0,699	3,040	2,960	0,477
0,40000	-0,398	5,560	5,650	0,749
0,80000	-0,097	10,600	10,970	1,033
* M1 y M2: Medida 1 y 2				

25 Como se muestra en la Fig. 2, las tasas de cambio en la absorbancia medidas de los especímenes que contienen AT III se trazaron log-log con respecto a los factores de dilución y las tasas de cambio en la absorbancia medidas de los especímenes de control (series de dilución a la mitad de solución patrón de endotoxina con agua para la prueba de endotoxina) se trazaron log-log con respecto a las concentraciones de endotoxina. Las dos líneas trazadas de

este modo se sometieron a prueba en términos de paralelismo a través de un ensayo de líneas paralelas. El ensayo se realizó a través de un análisis estadístico mediante el uso de un soporte lógico especializado para el ensayo de líneas paralelas (PL603; producto de Seikagaku Corporation). Como resultado, se estableció la linealidad de regresión en cada línea y se estableció el paralelismo entre las dos líneas. Por lo tanto, los resultados de la prueba fueron satisfactorios. La recuperación de Et, calculada dividiendo la concentración de Et (0,122 UE/mL) calculada a través del ensayo de líneas paralelas por la concentración de Et del control (0,125 UE/mL), fue de 97,6%.

<Ejemplo 10>

Prueba que emplea el ensayo de líneas paralelas (3)

Se añadió una solución patrón de 20 UE/mL de Et (2,5 µL) a una preparación de 50 Unidades/mL de AT III (472,5 µL), y la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió agua (6,25 µL), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de MgSO<sub>4</sub> 2M (18,75 µL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto mediante un mezclador de tubos de ensayo. La solución obtenida de este modo se calentó a 70°C durante 20 minutos por medio de un bloque térmico, y después se enfrió con hielo inmediatamente después de completar el calentamiento. La solución se hizo volver a la temperatura ambiente y se dispensó una alícuota (250 µL) en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 1,06 veces. A la porción restante (250 µL) de la mezcla, se le añadió agua (250 µL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un mezclador de tubos de ensayo. Se dispensó una alícuota (250 µL) de la mezcla diluida obtenida de este modo en otro recipiente en forma de una solución de AT III diluida 2,12 veces. Se repitió la operación, para preparar de ese modo una solución de AT III diluida 4,23 veces, una solución diluida 8,47 veces y una solución diluida 16,93 veces, y cada solución diluida se dispensó en otro recipiente. Por separado, se utilizó agua para la prueba de endotoxina en lugar de una preparación de AT III para preparar y proporcionar una serie de dilución similar sin el pretratamiento descrito en la presente memoria como especímenes de control. Cada solución (50 µL) se dispensó en una microplaca. Se añadió Endospecy ES-50 M (50 µL) a la microplaca, y la microplaca se agitó vigorosamente durante un minuto por medio de un lector de pocillos. Después de eso, se controló el cambio con el tiempo en la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 492 nm, mientras la microplaca se calentaba a 37°C durante 30 minutos. La Tabla 13 y la Figura 3 muestran los resultados.

[Tabla 13]

(1) Resultados de la medición del agua de la prueba de Et como espécimen				
Concentración de Et		Tasa de cambio de absorbancia (mAbs/min)		
UE/mL	valor log	M1	M2	Promedio (valor log)
0,00625	-2,204	0,860	0,880	-0,061
0,01250	-1,903	1,460	1,420	0,158
0,02500	-1,602	2,600	2,520	0,408
0,05000	-1,301	5,050	4,970	0,700
0,10000	-1,000	9,400	9,580	0,977
* M1 y M2: Medida 1 y 2				
(2) Resultados de la medición de la preparación de AT III como espécimen				
Razón de dilución		Tasa de cambio de absorbancia (mAbs/min)		
	valor log	M1	M2	Promedio (valor log)
0,05906	-1,229	0,920	0,930	-0,034
0,11813	-0,928	1,510	1,620	0,194
0,23625	-0,627	2,870	3,210	0,482

(1) Resultados de la medición del agua de la prueba de Et como espécimen				
Concentración de Et		Tasa de cambio de absorbancia (mAbs/min)		
UE/mL	valor log	M1	M2	Promedio (valor log)
0,47250	-0,326	4,580	5,540	0,702
0,94500	-0,025	7,960	8,640	0,919

\* M1 y M2: Medida 1 y 2

5 Como se muestra en la Fig. 3, las tasas de cambio de absorbancia medida de los especímenes que contienen AT III se trazaron log-log con respecto a los factores de dilución, y las tasas de cambio de absorbancia medidas de los especímenes de control (series de dilución a la mitad de solución patrón de endotoxina con agua para prueba de endotoxinas) se trazaron log-log con respecto a las concentraciones de endotoxinas. Las dos líneas trazadas de este modo se sometieron a prueba en términos de paralelismo a través de un ensayo de líneas paralelas. El ensayo se realizó a través de un análisis estadístico mediante el uso de un soporte lógico especializado para el ensayo de líneas paralelas (PL603; producto de Seikagaku Corporation). Como resultado, se estableció la linealidad de regresión en cada línea y se estableció el paralelismo entre las dos líneas. Por lo tanto, los resultados de la prueba fueron satisfactorios. La recuperación de Et, calculada dividiendo la concentración de Et (0,111 UE/mL) calculada a través del ensayo de líneas paralelas por la concentración de Et del control (0,106 UE/mL), fue de 104,7%.

10 Por lo tanto, como se muestra en los Ejemplos 8 a 10, a través de la realización del pretratamiento descrito en la presente memoria, se puede medir la Et presente juntamente con AT III con alta precisión, incluso en la prueba según el ensayo de líneas paralelas descrito en los patrones de preparación biológica.

15 De acuerdo con la presente invención, al realizar un pretratamiento de AT III que se va a someter a la prueba de Limulus, se puede reducir la interferencia de reacción observada cuando AT III se somete a la prueba de Limulus, y por lo tanto, la prueba de Limulus de AT III se puede llevar a cabo con una alta precisión. Además, según la presente invención, se espera que la prueba de Limulus de AT III se lleve a cabo de manera simple y rápida con un bajo coste.

20 **Lista de secuencias**

<110> SEIKAGAKU CORPORATION

25 <120> Agente de pretratamiento y método de pretratamiento de antitrombina III que se va a someter a prueba de Limulus

<130> F201302-3372

30 <150> JP2012-287475

<151> 28-12-2012

<160> 1

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> péptido

<400> 1

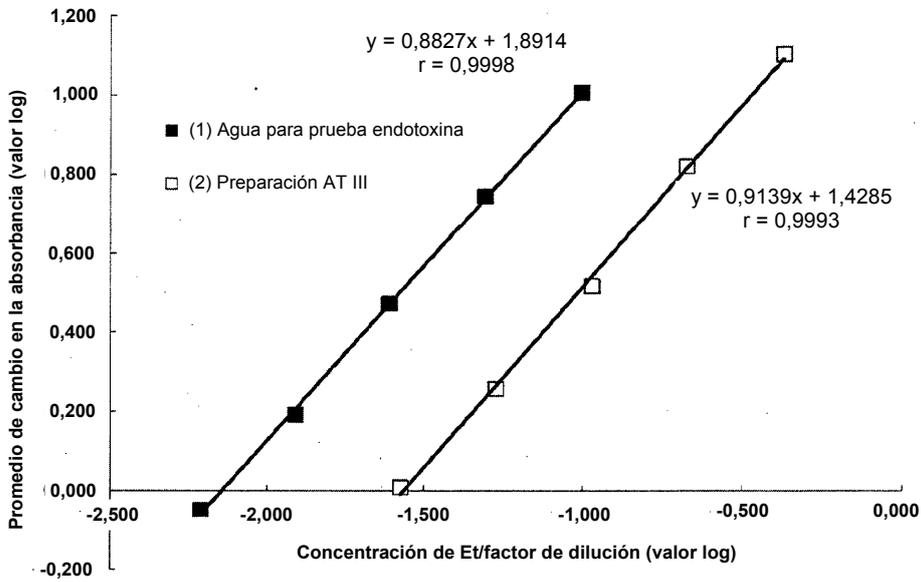
45 Ile Glu Gly Arg

1

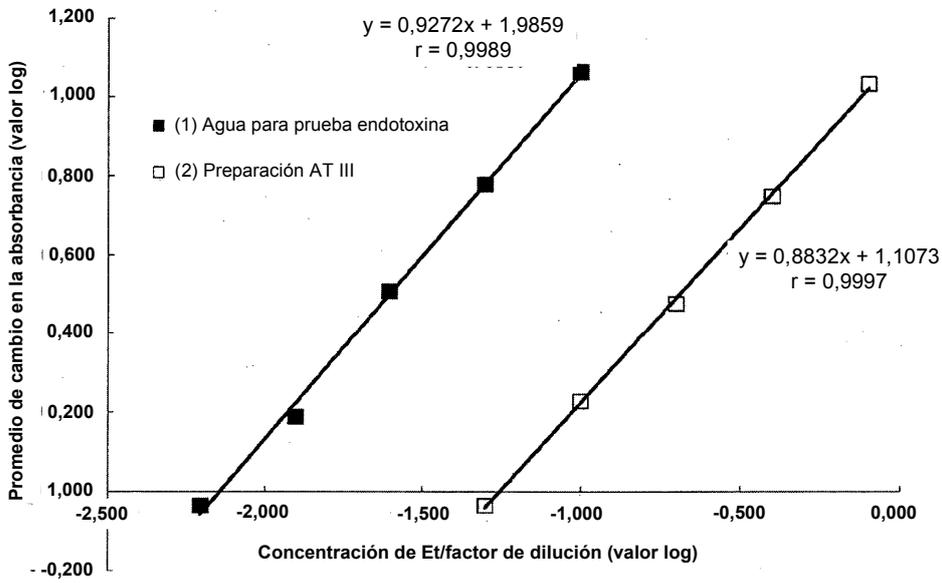
**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una sal de metal divalente en un pretratamiento de antitrombina III que se va a someter a prueba de Limulus,
- 5 cuya sal de metal divalente se utiliza para someter la antitrombina III a un tratamiento de inactivación de proteínas en presencia conjunta de la sal de metal divalente, antes de someter la antitrombina III a la prueba de Limulus.
- en donde el tratamiento de inactivación de proteínas no es un tratamiento con álcali en el que la antitrombina III presente juntamente con la sal de metal divalente se pone en contacto con un álcali, y
- en donde la antitrombina III es una preparación inyectable de antitrombina III.
2. El uso según la reivindicación 1, en donde la sal de metal divalente es una o más sales seleccionadas del grupo que consiste en un cloruro de metal divalente, un acetato de metal divalente, y un sulfato de metal divalente.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el metal divalente que constituye la sal de metal divalente es uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en magnesio, calcio, manganeso y cinc.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración del ión metálico divalente derivado de la sal de metal divalente es 0,5 mM o mayor cuando la antitrombina III está presente juntamente con la sal de metal divalente.
- 15 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde una sustancia diana de la prueba de Limulus es una endotoxina.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal de metal divalente está comprendida como un agente de pretratamiento en un kit de reactivo de Limulus.
- 20 7. Un método de pretratamiento de antitrombina III que se va a someter a una prueba de Limulus, comprendiendo el método someter la antitrombina III a un tratamiento de inactivación de proteínas en presencia conjunta de un agente de pretratamiento que contiene una sal de metal divalente,
- en donde el tratamiento de inactivación de proteínas no es un tratamiento con álcali en el que la antitrombina III presente juntamente con la sal de metal divalente se pone en contacto con un álcali, y
- 25 en donde la antitrombina III es una preparación inyectable de antitrombina III.
8. El método de pretratamiento según la reivindicación 7, en donde la sal de metal divalente es una o más sales de metales seleccionadas del grupo que consiste en un cloruro de metal divalente, un acetato de metal divalente, y un sulfato de metal divalente.
9. El método de pretratamiento según la reivindicación 7 u 8, en donde el metal divalente que constituye la sal de metal divalente es uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en magnesio, calcio, manganeso y cinc.
- 30 10. El método de pretratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la concentración del ión metálico divalente derivado de la sal de metal divalente es 0,5 mM o mayor cuando la antitrombina III está presente juntamente con el agente de pretratamiento.
11. El método de pretratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde una sustancia diana de la prueba de Limulus es una endotoxina.
- 35 12. El método de pretratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el tratamiento de inactivación de proteínas es un tratamiento térmico o un tratamiento con ácido.
13. El método de pretratamiento según la reivindicación 12, en donde el tratamiento térmico se realiza a una temperatura superior a 50°C.
- 40 14. El método de pretratamiento según la reivindicación 12, en donde el ácido empleado en el tratamiento con ácido es ácido clorhídrico.
15. Un método para medir una sustancia diana de la prueba de Limulus contenida en antitrombina III, comprendiendo el método tratar preliminarmente la antitrombina III mediante el método de pretratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, y someter a la prueba de Limulus la antitrombina III tratada preliminarmente.
- 45

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

