

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A 1
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	455.030	
	14-1-77	

PATENTE DE INVENCION

③① PRIORIDADES: ③② NUMERO	③③ FECHA	③④ PAIS
P 26 01 372.9	15-1-76	Rep. Federal Alemana

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	④⑧ CLASIFICACION INTERNACIONAL	④⑨ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

④④ TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANTI TROMBINA III EN PLASMA O SUERO"

④⑤ SOLICITANTE (S)	(HOE 76/B 001)
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Marburg/Lahn, República Federal Alemana

④⑥ INVENTOR (ES)
Dr. Hermann Erich Karges y Dr. Norbert Heimbürger

④⑦ TITULAR (ES)

④⑧ REPRESENTANTE	(P.- 64.932)
DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ	

1 La invención se refiere a un procedimiento para
la determinación cuantitativa de la actividad de antitrom-
bina III de soluciones acuosas, en especial en líquidos -
corporales tales como plasma o suero, a través de la for-
5 mación de complejos con heparina, por determinación del -
tiempo de coagulación.

 En la serie de las antitrombinas, que fueron --
designadas con los números I a VI, la antitrombina III --
(AT III) ocupa una posición importante. Se preparó en for-
10 ma pura y se caracterizó por la química de proteínas como
una α_2 -globulina con el peso molecular 65.000.

 Su efecto biológico como inhibidor no está limi-
tado a la trombina, sino que inhibe de modo especial tam-
bién el factor X y las otras serinproteasas de la serie -
15 de los factores de coagulación, pero también la plasmina.

 La interacción del inhibidor con enzimas trans-
curre lentamente en una reacción que es función del tiem-
po, y por consiguiente la AT III es designada como un in-
hibidor progresivo. La velocidad de la interacción entre
20 enzima e inhibidor es acelerada por medio de heparina, --
por lo que a partir del inhibidor progresivo AT III, se -
forma un inhibidor instantáneo.

 Por su posición central en el sistema de coagu-
lación y de fibrinólisis, y a causa de la posibilidad de
25 aumentar su velocidad de reacción por medio de heparina,

1 corresponde a la AT III una gran importancia en la regu-
lación de la coagulación sanguínea. Disminuciones relati-
vamente pequeñas del contenido de AT III deben conducir
ya a una elevación considerable del riesgo de trombosis.
5 A causa de la interdependencia entre el riesgo de trombo-
sis y el contenido de AT III de la sangre, se prestó a -
la determinación de la AT III una atención creciente en
los últimos años, y junto a los métodos de determinación
10 inmunológicos, se desarrollaron una serie de ensayos fun-
cionales. La mayoría de los ensayos biológicos transcu-
rren de modo que la trombina se incuba durante un tiempo
determinado con el plasma de muestra, y la actividad de
la trombina se determina después de la incubación, con -
ayuda de una curva de contrastado. A causa del efecto de
15 antitrombina I de la fibrina, este método requiere en mu-
chas recetas de determinación una desfibrinización del -
plasma, lo que en muchos casos se logra por calentamien-
to a 56°C o por medio de una enzima formadora de fibri--
na, obtenida de veneno de serpientes, que no es inhibida
20 por la AT III (por ejemplo reptilasa). Según la experien-
cia, la etapa de desfibrinización conduce a grandes inse-
guridades en la determinación, y es una medida que re- -
quiere mucho tiempo. Además de ello, la determinación no
permite ninguna diferenciación entre AT III y los otros
25 inhibidores progresivos de trombina conocidos de la bi--

1 bibliografía.

5 Se ha encontrado ahora que existen condiciones en las que se puede determinar la actividad de AT III en diferentes muestras, tales como plasma, suero, otros líquidos corporales u otros líquidos, sin que el fibrinógeno, la α_2 -macroglobulina o la α_1 -antitripsina perturban la determinación.

10 Objeto de la invención es un procedimiento para la determinación de AT III en sus soluciones acuosas, caracterizado porque se mezclan soluciones diluidas de AT III, un polímero sulfatado y trombina, y después de adición a una solución de fibrinógeno, se determina el tiempo de coagulación.

15 Se puede evitar una perturbación de la determinación por las sustancias antes mencionadas si, por ejemplo, en el caso de plasma o de suero, la muestra a determinar se diluye previamente al menos a 1 : 50. Tal dilución es posible porque la AT III de la muestra, por medio de polímeros orgánicos sulfatados con acción de heparina, tales como por ejemplo polietilensulfonato de sodio
20 con pesos moleculares de varios miles, preferiblemente heparina, se transforma de un inhibidor progresivo en un inhibidor inmediato.

25 La transformación de AT III en el inhibidor inmediato puede realizarse en un amplio intervalo de con--

1 centraciones con los polímeros sulfatados. A una unidad
de AT III (actividad de 1 ml de plasma normal) se pueden
añadir 10-500 unidades internacionales, de preferencia -
25 unidades internacionales de heparina o de un hepari--
5 noide. Un mayor exceso de heparina o de las cantidades -
correspondientes de los polímeros sulfatados influye des
favorablemente sobre el resultado de la determinación.

El procedimiento se lleva a cabo como sigue: A
la mezcla de, por ejemplo, 2 partes en volumen de mues--
10 tra diluida y 1 parte en volumen de solución del políme
ro sulfatado o de heparina, con aproximadamente 0,4 - 20
unidades internacionales, de preferencia 1 unidad inter
nacional, se añade 1 parte en volumen de una solución de
trombina con la actividad de 1-40 unidades NIH, de prefe
15 rencia 5-10 unidades NIH. Después de una incubación de -
esta mezcla a una temperatura definida de desde aproxima
damente 4°C hasta 45°C, de preferencia 37°C, durante un
período de 2-20 minutos, de preferencia 4 minutos, se --
añade con una pipeta una parte alícuota de la masa de in
20 cubación a una solución normalizada de fibrinógeno de --
aproximadamente 0,05 a 1% (peso/volumen), de preferen--
cia 0,4%, y se mide el tiempo de coagulación.

Según la invención, la determinación se puede
simplificar reuniendo trombina y el polímero que reaccio
25 na con AT III, (por ejemplo polietilensulfonato de sodio

1 o heparina) para formar un reactivo de AT III, y liofilizándolos eventualmente.

5 Por consiguiente, son objeto de la invención - además agentes para la determinación de antitrombina III en sus soluciones acuosas que contienen un polímero orgánico sulfatado con efecto de heparina, y trombina, en un preparado adecuado.

10 En una forma de realización preferida y mencionada como ejemplo, la determinación se lleva a cabo diluyendo previamente primero, por ejemplo, plasma, en la -- proporción 1 : 25 - 1 : 400, de preferencia 1 : 100, con una solución de un tampón alcalino con un valor de pH -- aproximadamente 7,5 - 10, de preferencia con tampón de -- trishidroximetilaminometano 0,1 M de pH 8,0, que contiene 15 0,025 M de NaCl. Después de ello se mezcla 1 parte de la muestra diluida con una parte de reactivo de AT III. El reactivo de AT III consiste en una mezcla de 0,2 - 10 unidades internacionales de polímero orgánico sulfatado, de preferencia 1 unidad internacional de heparina, y 0,5 20 - 20 unidades de NIH, de preferencia 10 unidades NIH, de trombina, en una solución de un derivado de gelatina reticulado con diisocianato, asequible bajo la marca comercial Haemaccel, que había sido diluido en la proporción 1 : 2 con una solución salina fisiológica, que no influye en la coagulación. La carga se incuba durante 4 minu- 25

1 tos a 37°C, y con una parte alícuota de la mezcla de incubación se determina el tiempo de coagulación en una solución normalizada de fibrinógeno.

5 Con una curva de referencia de trombina se puede calcular cuánta trombina había sido inhibida por la muestra. En comparación con un patrón, por ejemplo plasma humano normalizado, se determina cuántas unidades o % de la norma AT III estaban contenidas en la muestra, correspondiendo el 100% de la norma a la actividad de 1 ml de una mezcla de muestras del plasma de citrato de al menos 10 personas normales sanas.

10 La actividad puede ser determinada también con ayuda de una curva de regresión normalizada para AT III.

15 La determinación de AT III descrita permite un cálculo reproducible, sencillo y rápido del contenido de AT III de una muestra. Esta no es perturbada por otras antitrombinas, tales como α_2 -macroglobulina y α_1 -antitripsina, da una curva de regresión recta y coincide bien con la determinación inmunológica de la AT III.

20

Construcción de la curva de contrastado de trombina:

25 Una solución de trombina se diluye previamente a 6 unidades NIH. Partiendo de esta dilución, por adiciones de tampón, se preparan soluciones con las actividades de trombina 5, 4, 3, 2 y 1 unidades NIH. Se determi-

1 nan los tiempos de coagulación de estas soluciones en la
 mezcla con una solución normalizada de fibrinógeno (0,4%
 de fibrinógeno en tampón de trishidroximetilaminometano
 de pH 8,0) - 0,2 ml de solución de fibrinógeno y 0,1 ml
 5 de solución de trombina-. Sobre un papel doble logarítmi
 co se registran los tiempos de coagulación (en ordenadas)
 en función de las unidades de trombina (en abscisas). --
 Con una curva de contrastado de trombina se pueden leer
 las actividades residuales de trombina en las cargas de
 10 incubación, después de cálculo de los tiempos de coagula
 ción.

Curva de contrastado de trombina

	Unidades de trombina	Tiempos de coagulación
15	6 unidades NIH	31,1 segundos
	5 unidades NIH	35,5 segundos
	4 unidades NIH	41,3 segundos
	3 unidades NIH	51,6 segundos
	2 unidades NIH	70,7 segundos
20	1 unidad NIH	105,4 segundos

Ejemplo:

Determinación del contenido de AT III en una muestra de
 suero o de plasma.

25 La determinación se realiza en tres etapas de trabajo:

1 1ª) Dilución previa

5 Una muestra se diluye en la proporción 1 : 100 con tampón de trishidroximetilaminometano 0,1 M de pH 8,0, que contiene 0,025 M de NaCl, en 2 fases (por ejemplo, primera fase: 0,1 ml de muestra + 0,9 ml de tampón; segunda - fase: 0,1 ml de la muestra diluida en 1 : 10 + 0,9 ml de tampón).

10 2ª) Incubación

Se mezclan 0,2 ml de la muestra diluida en 1 : 100 procedente de la etapa de trabajo 1, y 0,2 ml del reactivo de AT III, y se incuban durante 4 minutos a 37°C.

15 3ª) Coagulación

Se mezclan 0,2 ml de solución de fibrinógeno normalizada a 0,4% en peso, y 0,1 ml de la mezcla de incubación procedente de la etapa de trabajo 2, y se determina el tiempo de coagulación a 37°C.

20 Con la curva de contrastado de trombina se lee la actividad residual de trombina en la carga de incubación, correspondiente al tiempo de coagulación, y con ello, por medio de la fórmula siguiente

25
$$T = T_v - T_a,$$

1 en la que T significa el número de las unidades de trombina
inhibidas en la muestra, T_v significa el número de las uni-
dades de trombina previamente dispuestas en la carga de in-
cubación, y T_a significa el número de las unidades de trom-
5 bina encontradas de nuevo después de la incubación, se cal-
culan cuantas unidades de trombina se inhiben por la muestra.

En comparación con un patrón, se puede calcular la
cantidad de AT III en la muestra por la fórmula sencilla:

10
$$G = \frac{T}{T_s} \cdot G_s,$$

en la que G significa el contenido de AT III de la muestra,
 T_v significa el número de unidades de trombina inhibidas
de una solución normalizada y G_s significa el contenido de
15 AT III de la solución normalizada.

- REIVINDICACIONES -

20 Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente
de Invención en España, por VEINTE años, son los que se re-
cogen en las reivindicaciones siguientes:

25 1ª.- Procedimiento para la determinación cuanti-
tativa de antitrombina III en plasma o suero, caracterizado
porque se mezclan 2 partes en volumen del plasma o suero

1 diluido con 1 parte en volumen de una solución de un políme
ro orgánico sulfatado con efecto de heparina con aproxima-
damente 0,4 a 20 unidades internacionales y 1 parte en volu
5 men de una solución de trombina con 1 a 40 unidades NIH, se
incuba la mezcla a una temperatura de 4 a 45°C durante 2 a
20 minutos, y a continuación se añade una parte de la mez-
cla de incubación a una solución de fibrinógeno y se deter-
mina el tiempo de coagulación de la mezcla.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª,
10 caracterizado porque se utiliza para ello una mezcla liofi-
lizada de un polímero orgánico sulfatado con efecto de hepa-
rina y trombina.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª
y 2ª, caracterizado porque el polímero orgánico sulfatado
15 es heparina.

4ª.- Procedimiento para la determinación cuanti-
tativa de antitrombina III en plasma o suero.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

20 Esta Memoria consta de once hojas escritas a má-
quina por una sola cara.

Madrid, 30.ENE.1978

P.A.

25 **Oscar de Elizaburu**
Por Poder

