



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo  
con los datos que figuran en la pre-  
sente descripción y según el con-  
tenido de la memoria adjunta.

11	NUMERO	482.215.	10	A1
21	FECHA DE PRESENTACION	4. Julio 1.979		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	922,135		5.7.78		ESTADOS UNIDOS

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			G01N 33/16		

64	TITULO DE LA INVENCION
	MEJORAS EN UN METODO DE RADIOINMUNOANALISIS DEL FACTOR DE PLAQUE- TAS 4 EN EL PLASMA SANGUINEO.

71	SOLICITANTE (ES)
	ABBOTT LABORATORIES.

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	14th Street & Sheridan Road, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A.

72	INVENTOR (ES)
	Erwin F. Workman, Jr., de nacionalidad estadounidense, el cual ha cedido sus derechos a la firma solicitante.

73	TITULAR (ES)
	El mismo solicitante.

74	REPRESENTANTE
	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

10

15

20

25

30

El factor de plaquetas 4 (FP4) es una proteína de pequeño peso molecular que es segregada de los  $\alpha$ -gránulos de las plaquetas cuando las células experimentan la reacción de liberación. Este fenómeno ocurre cuando las plaquetas se vuelven activas como consecuencia del contacto con el tejido sub-endotelial y otros diversos agentes fisiológicos como trombina, ADP y epinefrina. El factor de plaquetas 4 es cuantificado utilizando las técnicas clásicas de radioinmunoanálisis, *Thrombosis Research* 8, págs. 51-58 (1976) y *Thrombosis Research* 11, págs. 673-686 (1977). El factor de plaquetas 4 (FP4), esté radiomarcado o no, se combina con el antisuero específico. En una mezcla de proteína marcada y no marcada ( $^{125}\text{I}$ -FP4 y FP4), ambas se combinan a una cantidad limitada de antisuero en proporción con su concentración en la mezcla. Cuando un FP4 de plasma, suero o una solución patrón se equilibra con antisuero  $^{125}\text{I}$ -FP4 y FP4, la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -FP4 que se combina al antisuero es inversamente proporcional a la cantidad de FP4 no radiactivo presente en la muestra o solución patrón. Separando el complejo con antisuero del FP4 no combinado y midiendo la radiactividad del  $^{125}\text{I}$ -FP4 combinado en el complejo, pueden representarse las concentraciones de FP4 agregado en función del porcentaje de  $^{125}\text{I}$ -FP4 combinado. Después puede utilizarse una curva patrón para determinar la cantidad de FP4 en las muestras procedentes de los pacientes.

Para conseguir una determinación cuantitativa fiable del factor de plaquetas 4, son esenciales unas muestras patrón estables. Inesperadamente, se ha hallado que la parina, Merck Index, novena edición, 4510, estabiliza las mues-

1 tras patrón de factor de plaquetas 4 y el reactivo marcado.  
La heparina es un mucopolisacárido dextrógiro altamente sul-  
fatado, con propiedades anticoagulantes específicas. Está  
5 constituido por restos de D-glucosamina y ácido D-glucuróni-  
co y tiene un peso molecular de 20.000 aproximadamente. El  
ácido heparínico, sus sales de cationes alcalinos y alcali-  
no-térreos fisiológicamente aceptables, como sodio, potasio,  
litio, magnesio, calcio, amonio o similares, así como otros  
10 polisacáridos sulfatados tales como las pectinas y dextrinas  
sulfatadas que tienen una actividad similar a la de la hepa-  
rina, son fuentes adecuadas de actividad heparínica para po-  
ner en práctica esta invención.

El factor de plaquetas 4 es una proteína específica  
de las plaquetas con actividad neutralizadora de la hepari-  
15 na, que es liberada durante la reacción de liberación de  
plaquetas medida por el ensayo del tiempo de coagulación por  
heparina-trombina, Thrombosis Research, 8, págs. 51-58 (1976).

#### BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un patrón estabilizado pa-  
20 ra el inmunoanálisis del factor de plaquetas 4, constituido  
por una solución acuosa que contiene de 10 a 100 ng/ml del  
factor de plaquetas 4, una proteína portadora y una cantidad  
estabilizante efectiva de heparina. También esta invención  
proporciona un reactivo análogamente estabilizado donde el  
25 factor de plaquetas 4 está marcado con <sup>125</sup>I, así como el  
equipo de ensayo y los métodos para utilizar estos reactivos.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Una serie de patrones correspondientes a concentracio-  
nes fisiológicas del factor de plaquetas 4 de 0-100 ng/ml,  
30 por ejemplo 0, 10, 30, 50 y 100 ng/ml. Estos patrones contie-

1 nen una proteína portadora que favorece la separación del  
precipitado anticuerpo-antígeno y reduce la cantidad de fac-  
tor de plaquetas 4 adherida a las paredes de los recipientes  
de reactivos y ensayo., Una parte de la proteína portadora  
5 que precipita con el factor de plaquetas 4 marcado y sin  
marcar, que está combinado al anticuerpo en el antisuero.

Las soluciones acuosas son preferiblemente tamponadas  
a un pH fisiológicamente compatible, en la región de 5-10 apro-  
ximadamente. Por ejemplo, un tampón de dilución preferido es  
10 el tampón Tris 0,01M en cloruro sódico 0,3M, pH 8,2 aproxima-  
damente.

La proteína portadora, 0,05-2,0 % (en peso/volumen),  
aproximadamente mitad albúmina y mitad  $\gamma$ -globulina, es una  
cantidad de proteína portadora suficiente para producir una  
15 precipitación eficiente de antígeno-anticuerpo y reducir la  
adherencia de la muestra de ensayo a las paredes de los tu-  
bos de muestra. Una cantidad preferida de proteína portadora  
es alrededor de 0,2 % de albúmina de suero bovino y 1,5 mg/ml  
de  $\gamma$ -globulina bovina.

20 Es conveniente emplear un preservativo antibacteriano  
como azida sódica o timerosal para evitar el crecimiento de  
bacterias dentro de la solución patrón. Una cantidad eficaz  
preferida de preservativo antibacteriano es la constituida  
por 0,02 % de azida sódica. Los expertos en el campo de reac-  
25 tivos e inmunoanálisis observarán que es posible utilizar  
otros tampones, proteínas, preservativos y modificar las  
cantidades para obtener tampones diluyentes adecuados y can-  
tidades efectivas de proteínas portadoras y cantidades efec-  
tivas de preservativos antibacterianos.

30 Una cantidad estabilizante efectiva de heparina es

1 alrededor de 3 a  $10^{-5}$  unidades de actividad heparínica por  
ng de factor de plaquetas 4. La cantidad preferida es alre-  
5 dedor de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  unidades/ng. En cualquier caso, debe  
ser como mínimo alrededor de  $10^{-5}$  unidades/ng. Una unidad de  
10 actividad heparínica por mililitro de diluyente tamponado,  
conteniendo cada uno 10, 30, 50 y 100 ng, respectivamente,  
de factor de plaquetas 4, constituye una serie de patrones  
muy eficaz. Un preparado de heparina sódica típico contiene  
15 alrededor de 170 unidades/mg. Definición de una unidad de  
heparina de la Farmacopea de Estados Unidos: una unidad de  
heparina es la cantidad que, cuando se disuelve en 0,8 ml  
de solución salina y se agrega a 1 ml de plasma de oveja re-  
calcificado (0,2 ml de solución de cloruro cálcico, 10 g/l)  
hace que la mezcla permanezca fluída durante una hora como  
mínimo.

Esta invención también se refiere a un reactivo mar-  
20 cado con  $^{125}\text{I}$  en solución acuosa, con un preservativo anti-  
bacteriano, una proteína portadora así como una cantidad  
efectiva estabilizante de heparina, cuya radiactividad es  
generalmente inferior a  $0,5\mu\text{Ci/ml}$ , preferiblemente del orden  
de  $0,2-0,45\mu\text{Ci/ml}$  como cantidad efectiva de radiactividad  
para la detección.

25 Los reactivos heparínicos de esta invención están  
combinados convenientemente en un equipo de análisis para  
determinar el factor de plaquetas 4. Los siguientes ejemplos  
ilustran la invención y no se pretende que la limiten en  
espíritu ni alcance.

#### EJEMPLO 1

30 Se obtienen unas muestras de sangre por las técnicas  
habituales de venipuntura, se enfrían y se centrifugan. Se

1       retira el plasma y se introducen 50  $\mu$ l en tubos de ensayo  
identificados como muestras desconocidas.

5       En unos tubos de ensayo identificados como muestras  
patrón se introducen 50  $\mu$ l de patrones conteniendo 0, 10, 30,  
50 y 100 ng/ml de factor de plaquetas 4 en tampón Tris 0,01M  
(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol.HCl) en cloruro sódico  
0,15M, con 1,5 mg/ml de  $\gamma$ -globulina bovina, 0,2 % de  
seroalbúmina bovina, 1  $\mu$ /ml de heparina sódica y 0,02 % de  
azida sódica.

10       A los tubos de ensayo identificados como muestras  
ligantes no específicas se agregan mediante una pipeta 300  $\mu$ l  
de tampón diluyente.

15       Todas las muestras anteriores reciben 250  $\mu$ l de una  
solución de factor de plaquetas 4 marcado con  $^{125}\text{I}$ , con una  
radiactividad de 0,45  $\mu$  Ci/ml o menos, en tampón Tris 0,01M  
con cloruro sódico 0,15M, que contiene 0,2 % de seroalbúmina  
bovina, 1,5 mg/ml de  $\gamma$ -globulina bovina, 2,2 U/ml de hepari-  
na sódica y 0,02 % de azida sódica.

20       Los problemas y los patrones reciben después 250  $\mu$ l de  
antisuero de factor de plaquetas 4 de cabra en tampón Tris  
0,01M en cloruro sódico 0,15M, que contiene 0,2 % de sero-  
albúmina bovina, 1,5 mg/ml de  $\gamma$ -globulina bovina y 0,02 %  
de azida sódica.

25       Los tubos de recuento total se preparan introduciendo  
mediante una pipeta 250  $\mu$ l de factor de plaquetas 4 marcado  
con  $^{125}\text{I}$  en tubos diferentes.

Los tubos se incuban a 22-25°C durante unas 2 horas.

30       Todos los tubos excepto el tubo de recuento total  
(TRT) reciben 1 ml de sulfato amónico (al 73 % de la sa-  
turación). Después los tubos se mezclan, se centrifugan du-

1 rante 20 minutos a 1000 x g, se decanta el líquido que sobrenada y se mide en un contador de centelleo la radiactividad del precipitado de proteína-sulfato amónico.

5 RESULTADOS

1. Cálculo del porcentaje de <sup>125</sup>I-FP4 combinado al antisuero en el precipitado de sulfato amónico:

$$\frac{\text{cpm patrón}}{\text{cpm TRT}} \times 100 = \% \text{ combinado para el patrón}$$

$$\frac{\text{cpm problema}}{\text{cpm TRT}} \times 100 = \% \text{ combinado para el problema.}$$

10 2. Se representa el promedio de % combinado para cada patrón de FP4 en el eje de ordenadas (Y) en función de la correspondiente concentración de producto marcado para cada vial en el eje de abscisas (X). Empleando los cinco puntos, se traza la curva de ajuste óptimo.

15 3. Para determinar la concentración de FP4 en muestras desconocidas, trazar una línea horizontal desde el % combinado calculado en el eje de las Y hasta la curva. En el punto de intersección, trazar una línea vertical hasta el eje X y leer el correspondiente valor de FP4 para el problema.

20 Determinación de FP4

Curva patrón típica

<u>Patrón</u>	<u>Combinado/total</u>
0 ng/ml	50,28
10 ng/ml	39,66
30 ng/ml	28,53
50 ng/ml	23,90
100 ng/ml	19,18

25 Los resultados clínicos típicos son:

30 Normal: menos de 10 ng/ml en el plasma

1	Infarto de miocardio	} Elevados niveles, algunas veces superiores a 100 ng
	Enfermedad coronaria	
	Coagulación intravascular diseminada	
5	Válvulas cardíacas protésicas	

EJEMPLO 2

Muestras idénticas en todos los aspectos a excepción de que un grupo contiene 1 U/ml de heparina. Los patrones que contienen heparina (+) y los otros sin heparina (-) son analizados durante un periodo de 6 semanas.

RESULTADOS

Tiempo (semanas)	<u>Intersección 50 %, ng/ml</u>	
	<u>Heparina (+)</u>	<u>Heparina (-)</u>
0	26	32
15	1	23
	2	26
	3	24
	4	30
	5	30
20	6	24
		47

La intersección 50 % permanece razonablemente constante cuando hay presente heparina pero aumenta en el control cuando no se agrega heparina. Este aumento en la intersección 50 % indica una disminución de la sensibilidad y una variación aparente de la concentración de FP4 en los patrones.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

- 30
1. Mejoras en un método de radioinmunoanálisis del

1 factor de plaquetas 4 en el plasma sanguineo, donde se uti-  
lizan las concentraciones del factor de plaquetas 4 en pa-  
trones, para calcular las concentraciones del factor de pla-  
quetas 4 en el plasma, sanguineo, consistiendo dicho método  
5 en:

a) combinar competitivamente el factor de pla-  
quetas 4 marcado con  $125_{\text{I}}$  y el factor de plaquetas 4 proce-  
dente de las muestras de ensayo con el factor antisuero del  
factor de plaquetas 4;

10 b) precipitar; y

c) efectuar el recuento del factor de plaquetas  
4 marcado con  $125_{\text{I}}$  combinado;

15 cuyas mejoras comprenden utilizar patrones de factor de pla-  
quetas 4 constituidos por una solución acuosa que contiene  
el factor de plaquetas 4 opcionalmente marcado con  $125_{\text{I}}$ , una  
proteína portadora, una cantidad estabilizante efectiva de  
actividad heparínica y, opcionalmente, una cantidad antibac-  
teriana efectiva de un preservativo.

20 2. Mejoras según la reivindicación 1, donde el pa-  
tron estabilizado de inmunoanálisis del factor de plaquetas  
4 comprende una solución acuosa que contiene de 10 a 100  
ng/ml de factor de plaquetas 4, una proteína portadora y una  
cantidad estabilizante efectiva de actividad heparínica.

25 3. Mejoras según la reivindicación 1, donde el  
patron estabilizado de inmunoanálisis del factor de plaque-  
tas 4 comprende un diluyente tamponado que contiene de 10  
a 100 ng/ml de factor de plaquetas 4, una proteína portado-  
ra, una cantidad antibacteriana efectiva de un preservativo  
y una cantidad estabilizante efectiva de actividad heparínica.

30 4. Mejoras según la reivindicación 1, donde 1

1 patrón estabilizado de inmunoanálisis del factor de plaque-  
tas 4 está marcado con  $^{125}\text{I}$ , y comprende una solución acuosa  
que contiene factor de plaquetas 4 marcado con  $^{125}\text{I}$  con has-  
5 ta 0,45  $\mu\text{Ci/ml}$  de radiactividad, una proteína portadora y  
una cantidad estabilizante efectiva de actividad heparínica.

5. Mejoras según la reivindicación 1, donde el  
patrón estabilizado de inmunoanálisis del factor de plaque-  
tas 4 está marcado con  $^{125}\text{I}$  y comprende un diluyente tampo-  
nado que contiene factor de plaquetas 4 marcado con  $^{125}\text{I}$ .  
10 con hasta 0,45  $\mu\text{Ci/ml}$  de radiactividad, una proteína porta-  
dora, una cantidad antibacteriana efectiva de un preservati-  
vo y una cantidad estabilizante efectiva de actividad heparí-  
nica.

6. Se reivindica por último como objeto sobre el  
15 que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
MEJORAS EN UN METODO DE RADIOINMUNOANALISIS DEL FACTOR DE  
PLAQUETAS 4 EN EL PLASMA SANGUINEO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la presente memoria descriptiva que consta de diez páginas  
20 mecanografiadas.

Madrid, 4 Julio 1.979

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25

30