

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 271**

51 Int. Cl.:
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04788891 .2**
96 Fecha de presentación: **21.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1682863**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Fosfolípidos solubles para uso en ensayos de factores de coagulación**

30 Prioridad:
22.09.2003 US 504796 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL
HILL (100.0%)
308 BYNUM HALL, CAMPUS BOX 4105
CHAPEL HILL, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:
**LENTZ, BARRY R.;
MONROE, DOUGALD M., III;
MAJUMDER, RINKU y
HUANG, JINMING**

74 Agente/Representante:
LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 390 271 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

Fosfolípidos solubles para uso en ensayos de factores de coagulación.

La presente invención se refiere a nuevos reactivos y métodos para la realización de ensayos de actividad de coagulación, en particular, nuevos reactivos fosfolípidos solubles y los ensayos de actividad de coagulación que usan éstos.

Antecedentes de la invención

La tradicional vista de la "cascada" de coagulación de la sangre se ilustra en la **Figura 1** y consiste de dos vías convergentes: la vía intrínseca o "de contacto" se definió originalmente en base a la adición de arcilla u otros "reactivos de contacto" a la sangre en un tubo de ensayo, y la vía extrínseca que ahora se cree que es la vía por la que se inicia la coagulación después de la lesión del tejido. Ambas vías culminan en la producción del factor X_a de coagulación de la sangre (FX_a , una proteasa de serina) por vías que dependen de las membranas. En una de estas, el factor IX_a (FIX_a , también una proteasa de serina) y su cofactor, el factor $VIII_a$ ($FVIII_a$), activan el factor X (FX) en una reacción que depende de las membranas de plaquetas activadas (la vía intrínseca). En la otra (la vía extrínseca), el FX se activa por otra proteasa de serina del plasma, el factor de VII_a ($FVII_a$) en combinación con un cofactor situado en la membrana celular (por lo tanto, "extrínseca" al plasma), el factor tisular (TF). Estas dos vías se unen en la "vía común", en la cual el FX_a junto con su cofactor el factor V_a (FV_a), activa la protrombina a trombina en el paso final en la cascada de coagulación de la sangre. Si bien se cree en general que la exposición del TF al plasma después del daño tisular es el desencadenante que inicia la coagulación de la sangre, también está claro que los complejos dependientes de la membrana de las plaquetas (X_a-V_a , IX_a-VIII_a) son esenciales para amplificar el proceso de modo que se forme un coágulo. De hecho, la mayoría de los trastornos de la coagulación familiares implican defectos en estas cuatro proteínas.

La activación de la protrombina se lleva a cabo por el complejo de enzima FX_a-FV_a , llamado "protrombinasa" en presencia de Ca^{2+} , y membranas cargadas negativamente (Mann, y otros (1990) Blood 76 (1):1-16; Rosing, y otros (1980) J. Biol. Chem. 255 (1):274-83). *In vivo*, las membranas se derivan de las plaquetas activadas en forma de vesículas (Sandberg, y otros (1985) Thromb Res 39 (1): 63-79; Sims, y otros (1989) J. Biol. Chem. 264 (29):17049-57) sobre cuya superficie se expone la fosfatidilserina (PS) (Comfurius, y otros (1990) Biochim. Biophys. Acta 1026 (2): 153-60), que está enterrada en la superficie citoplásmica de las plaquetas en reposo (Schick, y otros (1976) J. Clin. Invest. 57 (5):1221-6). Se sabe que la PS tiene un papel específico en la activación de la protrombina (Jones, y otros (1985) Thrombosis Res. 39, 711-724; Comfurius, y otros (1994) Biochemistry 33 10319-10324), pero la naturaleza de ese papel no se ha comprendido aún. Debido a que se deben cortar dos enlaces en la protrombina, la activación puede proceder a través de dos posibles intermediarios proteolíticos (**Figura 4**), la meizotrombina ($MzII_a$), probablemente el principal intermediario *in vivo* (Rosing y Tans (1988) Thromb Haemost 60 (3): 355-60; Nesheim y Mann (1983) J. Biol. Chem. 258 (9): 5386-91) y la pretrombina 2 más el fragmento 1.2. (Pre2 & F1.2; **Figura 2**) (Nesheim y Mann (1983) *supra*; Krishnaswamy, y otros (1987) J. Biol. Chem. 262 (7): 3291-9). Se cree que el FV_a y las membranas de PS dirigen la activación a través del intermedio meizotrombina, pero la PS tiene el papel principal en este sentido (Boskovic, y otros (2001) J. Biol. Chem. 276 (31): 28686-93; Banerjee, y otros (2002) Biochemistry 41 (3): 950-7; Wu, y otros (2002) Biochemistry 41 (3): 935-49). El hecho de que la PS tenga este papel significativo, y que también altere la actividad del factor X_a (Koppaka, y otros (1996) Biochemistry 35:7482) implica un papel regulador para este lípido de las plaquetas.

El factor IX de la coagulación también desempeña un papel fundamental en la coagulación de la sangre como se muestra por la tendencia a la hemorragia asociada con la deficiencia congénita del factor IX (la hemofilia B). La forma activada del X, FIX_a , desempeña un papel clave en la generación de trombina en el tapón de plaquetas por la unión con el $FVIII_a$ sobre las membranas de plaquetas para formar el complejo Xasa que activa X a X_a . Los fosfolípidos cargados negativamente, especialmente la PS, también son esenciales para este proceso. Las membranas que contienen PS aumentan la k_{cat} del complejo factor $VIII_a-IX_a$ en más de 1000-veces (Gilbert, y otros (1996) J. Biol. Chem. 271 11120). El $FVIII_a$ y el FIX_a se unen específicamente y con gran afinidad a las membranas que contienen PS. Sin embargo, al igual que para el complejo de protrombinasa, el papel exacto de la PS en la activación de FX no se conoce.

La WO 01/44493 describe el uso de fosfolípidos insolubles tales como la cefalina de cerebro de conejo; los fosfolípidos naturales o sintéticos, o las plaquetas en un ensayo para la actividad de coagulación. Sin embargo, hay sólo un limitado intervalo de pacientes para este ensayo. Aunque se ha informado sobre los efectos de los fosfolípidos sobre las actividades del factor IX_a (Gilbert y Arena 1997, Biochem. 361,10768-76), no se ha observado ni reclamado ningún uso beneficioso en cuanto a su sensibilidad.

Las preparaciones sintéticas de membrana, que se pueden derivar a partir de extractos de fosfolípidos de plaquetas, del cerebro o los pulmones de mamíferos, o la soja, se usan comúnmente en los actuales ensayos de coagulación. Más recientemente, las membranas sintéticas preparadas a partir de mezclas de lípidos sintéticos purificados se han usado

5 para mejorar la reproducibilidad y la vida útil de los ensayos. También están disponibles comercialmente fosfolípidos sintéticos (*por ejemplo*, de Avanti® Polar Lipids Inc; Alabaster, AL). Incluso estas preparaciones de membranas sintéticas sufren de los inconvenientes de (1) producirlas es laborioso, (2) cada lote se debe calibrar individualmente para que coincida con los tiempos de coagulación de los patrones existentes (*ver, por ejemplo*, la patente Estados Unidos núm. 6.596.543 B2 de Wang, y otros) y (3) tienen sólo una vida útil limitada.

En consecuencia, existe una necesidad en la materia de reactivos y métodos mejorados para la realización de ensayos de coagulación y otros ensayos de actividad de los factores de la coagulación.

Breve descripción de la invención

10 La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que se pueden usar fosfolípidos solubles en lugar de membranas de plaquetas o membranas sintéticas en ensayos de coagulación y otros ensayos de actividad de coagulación. Los inventores demuestran en la presente que el complejo de protrombinasa desencadenado por el fosfolípido soluble de unión al FX_a y FV_a humano es totalmente activo (*es decir*, funcionalmente equivalente al complejo unido a la membrana) en la activación de la protrombina.

15 Los fosfolípidos solubles de la invención tienen un número de ventajas sobre las vesículas lipídicas convencionales en términos de reproducibilidad, facilidad de fabricación y mejora de la vida útil. Además, las composiciones de fosfolípidos solubles descritos en la presente pueden ser más adecuadas para uso en ensayos de coagulación de sangre o plasma de pacientes con lupus.

20 Así, en un aspecto, la invención proporciona el uso de un fosfolípido que es soluble en una muestra que comprende sangre o plasma de un sujeto en un ensayo para la actividad de coagulación, en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra es sustituido por las membranas de plaquetas o las membranas sintéticas en el ensayo del factor de coagulación.

25 Como otro aspecto, la invención proporciona un método para realizar un ensayo para la actividad de coagulación en una muestra que comprende sangre o plasma de un sujeto, caracterizado porque el fosfolípido que es soluble en la muestra se sustituye por las membranas de plaquetas o la membrana sintética en el ensayo.

30 La invención proporciona un método de evaluación de la actividad de coagulación que comprende:

(a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con:

- (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
- (ii) un activador de contacto; y
- (iii) calcio;

35 (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación de la trombina; y

(c) detectar la actividad del factor X_a o la trombina, en la que la actividad del factor X_a o la trombina es indicativa de la actividad del factor de coagulación en la muestra.

La invención proporciona un método para realizar un ensayo de coagulación que comprende:

40 (a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con:

- (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
- (ii) un activador de contacto; y
- (iii) calcio;

45 (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación del coágulo.

La invención proporciona un método para detectar una deficiencia en la actividad de la vía intrínseca de la coagulación que comprende:

(a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con:

- (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
 - (ii) un activador de contacto; y
 - (iii) calcio;
- 5 (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación del coágulo;
- (c) determinar un tiempo de coagulación para la muestra;
- (d) comparar el tiempo de coagulación determinado para la muestra con un patrón, en donde un tiempo de coagulación prolongado en comparación con el patrón es indicativo de una deficiencia en la actividad de la vía intrínseca de la coagulación.
- 10 La invención también proporciona un método para controlar el tiempo de coagulación en un sujeto después del tratamiento con heparina que comprende:
- (a) obtener una muestra que comprende sangre o plasma de un sujeto que se ha dado tratamiento con heparina;
 - (b) combinar la muestra con:
 - (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
- 15 (ii) un activador de contacto; y
- (iii) calcio;
- (c) incubar la mezcla de (b) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación del coágulo;
- (d) determinar un tiempo de coagulación para la muestra, de este modo controlar el tiempo de coagulación en el sujeto después del tratamiento con heparina.
- 20 La invención proporciona un método para evaluar la actividad del factor VII_a que comprende:
- (a) combinar una muestra que comprende plasma con:
 - (i) un fosfolípido soluble;
 - (ii) el factor tisular soluble; y
- 25 (iii) calcio;
- (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación de la trombina; y
- (c) detectar la actividad de la trombina, en donde la actividad de la trombina es indicativa de la actividad del factor VII_a en la muestra.
- 30 La invención proporciona un método para evaluar la actividad de un factor de coagulación de la vía intrínseca de la coagulación que comprende:
- (a) combinar una muestra que comprende plasma con:
 - (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
 - (ii) el factor X exógeno;
- 35 (iii) los factores de la coagulación activados dependientes de fosfolípidos diferentes del factor X que son dependientes del factor de coagulación que se evalúa en la vía intrínseca de la coagulación o se requieren para la activación del factor de coagulación que se evalúa; y
- (iii) calcio;
- 40 (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación del factor X a factor X_a; y
- (c) detectar la actividad del factor X_a, en donde la actividad del factor X_a es indicativa de la actividad del factor de coagulación en la muestra.

En modalidades particulares, este aspecto de la invención se practica para evaluar la actividad del FVIIIa

La invención proporciona adicionalmente composiciones de ensayo para practicar los métodos de la invención.

- 5 Los anteriores y otros aspectos de la presente invención se explican con más detalle en la descripción que se expone a continuación.

Breve descripción de las figuras

10 **La Figura 1** presenta la vista tradicional de la "cascada" de coagulación de la sangre. Que consta de dos "vías" convergentes, la vía intrínseca o "de contacto" que se definió originalmente en base a la adición de arcilla o de otro tipo de "reactivo de contacto" a la sangre en un tubo de ensayo, y la vía extrínseca que ahora se cree que es la vía por la cual se inicia la coagulación después de la lesión del tejido. Estas dos culminan en la producción del factor X_a , por reacciones que dependen de las membranas (flechas con una línea discontinua), una en las membranas de plaquetas activadas (la vía intrínseca), y una en las membranas de las células dañadas en el punto de la herida (la vía extrínseca). Estas dos vías se unen en la "vía común", en la cual se activa la protrombina a trombina en el paso final en la cascada de la coagulación de la sangre. La trombina es el metabolito central de la coagulación de la sangre. La producción de trombina se lleva a cabo por un complejo enzimático, llamado "protrombinasa", que consiste en los factores de la coagulación sanguínea X_a (FX_a , una proteasa de serina) y V_a (FV_a , un cofactor), Ca^{2+} , y membranas cargadas negativamente.

20 **La Figura 2** muestra el ensamblaje del complejo de protrombinasa según se controló por la velocidad de formación de trombina en presencia de C6PS. La velocidad inicial de formación de trombina se controló por la fluorescencia de DAPA. Se realizaron mediciones de fluorescencia de flujo detenido a 37°C con concentraciones finales de la cámara de mezcla de protrombina de 1 μ M, DAPA 5 μ M, factor X_a 1 nM, C6PS 400 μ M y diversas concentraciones del factor V_{a2} (**Panel A**) o V_{a1} (**Panel B**) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM. Las velocidades iniciales se ajustaron a un modelo de un solo sitio de unión como se describe en la presente para determinar el K_d^{eff} de unión del factor X_a al factor V_{a2} en presencia de C6PS 400 μ M ($2,4 \pm 0,3$ nM). El recuadro en el Panel A muestra el tamaño de los agregados detectados por dispersión cuasi-elástica de luz en concentraciones crecientes de C6PS bajo las condiciones de estos experimentos. La aparición brusca de los agregados en C6PS 700 μ M definió la concentración micelar crítica bajo estas condiciones experimentales.

30 **La Figura 3** muestra la caracterización del complejo formado por FX_a y FV_{a2} en presencia de C6PS soluble. Una mezcla de FX_a y FV_{a2} en ausencia (carril 1 del gel) y presencia (carril 2) de C6PS 400 μ M (Ca^{2+} 5 mM) se analizó por electroforesis nativa en gel de poliácridamida en un gel estándar de 6% (Majumder, y otros (2002) *supra*). También se muestra un gráfico log-log de los coeficientes de retardo frente a la masa molecular de diferentes proteínas de referencia (círculos en blanco). Se añadieron puntos a este gráfico para los coeficientes de retardo obtenidos para el FX_a (triángulo) o el FV_{a2} (estrella de 4 puntas) en ausencia de C6PS, y del complejo $FX_a \bullet FV_{a2}$ (estrella de 5 puntas) formado en presencia de C6PS. El peso molecular aparente del complejo, como se identificó en este gráfico, fue de $224 \pm 3,7$ kilodaltons. El recuadro en la parte inferior izquierda (diamantes) muestra la fluorescencia de [5 - (dimetilamino)-1-naftalenosulfonil] glutamyl cilarginil clorometil cetona (DEGR)- X_a modificado, preparado por medio del uso de métodos estándar (Majumder, y otros (2002) *supra*), como una función de FV_{a2} agregado, que produce una efectiva constante de disociación (K_d^{eff}) de $2 \pm 0,2$ nM.

40 **La Figura 4** muestra una representación esquemática de la activación de la protrombina (II) humana. El factor X_a corta dos enlaces peptídicos $\{Arg^{273}-Thr^{274}\}$ y $\{Arg^{322}-Ile^{323}\}$ en la protrombina para la activación a trombina (II_a), así se crean dos vías posibles de activación (A & B y C & D) y dos posibles intermediarios liberados (Pre2 y MzII_a). Una tercera vía posible de activación (E) se produce cuando no se libera el intermediario ("canalización" o activación de proceso). Se muestran las constantes de velocidad (k_{cat}/K_M en unidades de $10^8 M^{-1} S^{-1}$) para las diferentes etapas catalizadas ya sea por el complejo $FX_a-FV_{a2}-C6PS$ (texto subrayado; resultados descritos en la presente) o por el complejo de membrana FX_a-FV_a-PS/PC (texto normal; Weinreb, y otros (2003) J. Biol. Chem. 278 (8): 5679-84).

50 **La Figura 5** muestra las velocidades iniciales de formación de trombina a partir de intermediarios como una función de la concentración de sustrato. La activación se inicia por la mezcla de flujo detenido de volúmenes iguales de sustrato y DAPA en una jeringa con el complejo de protrombinasa en otra jeringa. Los sustratos eran MzII_a (**Panel A**) y una mezcla equimolar de Pre2 & F1.2 (**Panel B**). La concentración de C6PS fue: 50 μ M (triángulos invertidos), 100 μ M (triángulos), 200 μ M (diamante), 300 μ M (cuadrado) y 400 μ M (círculo). Los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ (triángulos en blanco) y K_M (cuadrados en blanco) para la conversión de MzII_a y Pre2 + fragmento de 1.2 a trombina se representaron gráficamente frente a la concentración de C6PS en los recuadros de los Paneles A y B, respectivamente.

55 **La Figura 6A** muestra los mejores ajustes de simulaciones para el curso temporal inicial de la proteólisis de protrombina observada. La proteólisis de la protrombina (0,5 μ M) catalizada por el factor X_a (1 nM) en presencia de $CaCl_2$ 5 mM, el factor V_{a2} (5 nM), y C6PS 400 μ M, se controló a 37°C, ya sea por medio de la actividad (símbolo sombreado) de la trombina (círculos) y la MzII_a (cuadrados), o por medio de SDS-PAGE y densitometría (símbolos en blanco). El curso temporal de formación de Pre2 detectado por SDS-PAGE se presentó como triángulos en blanco. El recuadro muestra

la velocidad de cambio de la fluorescencia de DAPA (2,5 mM) en las mismas condiciones (triángulos en blanco), junto con la fluorescencia de DAPA calculada (Wu, y otros (2002) *supra* a partir de los datos de actividad que se muestran en esta Figura.

5 **La Figura 6B** muestra los cursos temporales calculados de la trombina formada a través de las vías de Pre2 (línea de puntos discontinuos), MzII_a (línea discontinua), y la canalización (línea continua), con círculos sombreados se muestra el curso temporal experimental para la formación de la trombina total.

10 **La Figura 7** ilustra que los complejos protrombinasa ensamblados en presencia ya sea de C6PS o de las membranas de PS/PC son esencialmente idénticos. Las velocidades (k_{cat}/K_M) de activación de la protrombina (cuadros de la izquierda) y los porcentajes de protrombina inicialmente canalizada a trombina (cuadros de la derecha) se muestran para ambos complejos. Los datos de membrana se conocen bien (Weinreb, y otros (2003) *supra*).

15 **La Figura 8** muestra la unión de C6PS al factor IX_a como se detecta por la fluorescencia intrínseca. La fluorescencia integrada intrínseca del factor IX_a 0,20 μM en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, y PEG 0,6%, pH 7.5 se midió como una función de la concentración de C6PS a 22 ° C para seguir la unión de C6PS. El recuadro muestra la titulación de fluorescencia de ANS en presencia del factor IX_a 200 nM y calcio con el aumento repentino de fluorescencia que indica C6PS CMC.

La Figura 9 muestra la actividad amidolítica del IX_a (300 nM) en Tris 20 mM, NaCl 150 mM, calcio 5 mM y PEG 0,6%. El ensayo se realizó en presencia de Leu-PHG-Arg-pNA.AcOH 1 mM y concentraciones crecientes de C6PS.

20 **La Figura 10** muestra la actividad proteolítica de IX_a (10 nM) en Tris 20 mM, NaCl 150 mM, calcio 5 mM y PEG 0,6%. El ensayo se realizó en presencia de concentraciones crecientes de C6PS. El ajuste hiperbólico da una K_d de 164 μM, que es similar a la K_d obtenida en la **Figura 9**.

La Figura 11 muestra la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a en presencia de C6PS 700 μM, con diferentes concentraciones del factor X. El recuadro ilustra que la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a en C6PS 700 μM es idéntica a la velocidad determinada en presencia de 20% de la membrana PS/PC (línea discontinua), C6PS (línea continua).

25 **La Figura 12** ilustra la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a versus la concentración de C6PS a diferentes concentraciones de calcio 0 mM (cuadrado sombreado), 1 mM (línea horizontal sombreada), 2 mM (línea horizontal sombreada), 3 mM (línea vertical sombreada), 4 mM (en blanco), 5 mM (línea ondulada sombreada).

La Figura 13 muestra la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a 2,5 nM y el factor VIII_a 10 nM en presencia de C6PS 600 μM, controlado a diferentes concentraciones del factor X.

30 **La Figura 14** muestra el factor V_a bovino (100 nM) incubado con APC (10 nM) en presencia de C6PS 200 μM (círculos), C6PS 4 μM (cuadrados) o sin C6PS (triángulos) a 37°C. Se añadieron alícuotas de esta mezcla (10 μl), a intervalos de tiempo seleccionados, a una cubeta que contiene la protrombina (1,4 μM), DAPA (5 μM), vesículas de PCPS (50 μM), y el factor X_a (10 nM) en un volumen de ensayo total de 1 ml. La intensidad de fluorescencia de la trombina-DAPA se controló con el tiempo. Bajo estas condiciones, la velocidad de formación de trombina fue proporcional a la velocidad de incremento de la fluorescencia de DAPA y se relacionó linealmente con la cantidad del factor V_a activo. Las dos isoformas del factor V_a, V_{a1} (**Marco A**) y V_{a2} (**Marco B**) se inactivaron a diferentes velocidades y en diferentes grados de APC en función de la disponibilidad de C6PS.

La Figura 15 muestra los resultados del ensayo cromogénico del FVIII mediante el uso de LUV 20 μM (vesículas unilaminares grandes).

40 **La Figura 16** muestra los resultados del ensayo cromogénico del FVIII mediante el uso de C6PS 875 μM.

La Figura 17 ilustra el efecto de diferentes niveles C6PS en el ensayo cromogénico del FVIII.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que los fosfolípidos solubilizados son funcionalmente equivalentes a las membranas de plaquetas y pueden sustituirlas en reacciones catalizadas por membranas dentro de la vía intrínseca de la coagulación. En particular, los inventores demostraron que un complejo de protrombinasa fuerte se ensambla en solución bajo la influencia reguladora de una fosfatidilserina solubilizada (PS). Este complejo es funcionalmente equivalente al complejo ensamblado en las membranas que contienen PS (**Figura 7**). Los resultados que se proporcionan en la presente demuestran adicionalmente que las moléculas de fosfolípidos solubles regulan el ensamblaje, la actividad, y el mecanismo de reacción del complejo de protrombinasa.

50 El hallazgo de que un fosfolípido solubilizado puede sustituir a una membrana que contiene fosfolípidos en la cascada de la coagulación intrínseca y es funcionalmente equivalente a la misma es bastante sorprendente. La comprensión actual de la vía intrínseca es que se requiere una superficie de membrana de dos dimensiones para reunir a los factores

individuales y para acelerar la formación del complejo. Los presentes inventores han descubierto que, de hecho, la superficie de la membrana en sí es prescindible; las moléculas de fosfolípidos, ya sea unida a la membrana o en una forma solubilizada, tienen una actividad reguladora específica y de segundo mensajero que da como resultado la aceleración de la cascada de la coagulación.

5

La presente invención se describe a continuación con más detalle con referencia a las figuras adjuntas, en las que se muestran las modalidades preferidas de la invención. Esta invención puede, sin embargo, realizarse en formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente. Más bien, estas modalidades se proporcionan para que ésta descripción sea exhaustiva y completa, refleje completamente el alcance de la invención a aquellos con experiencia en la materia.

10

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien con experiencia en la materia a la que pertenece esta invención. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención.

15

Salvo que se indique lo contrario, se pueden usar los métodos estándar para la preparación de las muestras de plasma y de sangre, para llevar a cabo los ensayos estándar de coagulación o los ensayos para factores de la coagulación específicos (*por ejemplo*, los ensayos cromogénicos o fluorescentes para la actividad de la trombina o el factor X_a), los inhibidores de los factores de la coagulación y similares. Aquellos con experiencia en la materia conocen tales técnicas. Véase, *por ejemplo*, en los capítulos 60 y 69 de Hematología Clínica Wintrobe, 10^a edición, G. Richard Lee, John Foerster y otros (Eds), Williams & Wilkins, Baltimore (1999); Hemostasia y Trombosis: Principios Básicos y Práctica Clínica, 4^a edición, Robert W. Colman, Jack Hirsh y otros (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia (2001).

20

Tal como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25

Reemplazo de las membranas de lípidos en ensayos de coagulación convencionales.

30

Como se describió anteriormente, muchas etapas de la cascada de la coagulación dependen de membranas de plaquetas *in vivo* (**Figura 1**). Ensayos convencionales para la evaluación de la actividad de coagulación o de la actividad de los componentes individuales de la cascada de la coagulación se basan en lípidos en forma de preparaciones de membranas sintéticas. Tales preparaciones son típicamente extractos de fosfolípidos (*por ejemplo*, a partir del cerebro o los pulmones de mamíferos) o repeticiones sintéticas de fosfolípidos naturales, que forman estructuras lamelares, insolubles similares a las membranas. La presente invención se puede practicar en relación con cualquier ensayo dependiente de membrana conocido en la materia, donde los fosfolípidos solubles de la invención son sustituidos por (*es decir*, en lugar de) las membranas de plaquetas o las preparaciones sintéticas de membrana. Como alternativa, los métodos y kits de ensayo de la invención no dependen de las membranas de plaquetas o las preparaciones de membranas sintéticas añadidas exógenamente. "Las membranas sintéticas" o la "preparación de membrana sintética" (y variaciones de estas) como se usa en la presente significa cualquier suspensión en tampón acuoso de lípidos naturales o sintetizados químicamente, insolubles en agua que forman superficies como la membrana para uso en ensayos de coagulación. En modalidades representativas particulares, la presente invención se usa en conexión con ensayos que miden la actividad de la vía intrínseca de la coagulación o los ensayos específicos para la actividad de FV_a, la actividad del FVII_a, la actividad de FVIII_a, la actividad del FIX_a, la actividad del FX_a, o una combinación de éstos. Las composiciones de fosfolípidos solubles de la invención también se pueden usar en conexión con ensayos para la resistencia de la proteína C activada (APC) o los ensayos para la presencia de otros (anticoagulante) factores inhibidores (*por ejemplo*, los anticuerpos para FV, FVIII, FIX, FX, FXI o la protrombina o los anticoagulantes lúpicos).

35

40

45

Como se usa en la presente, un fosfolípido "soluble" esencialmente no comprende ningún agregado (*por ejemplo*, como micelas, estructuras lamelares o no lamelares). Por "esencialmente ningún agregado", se entiende que el fosfolípido soluble contenga menos que aproximadamente 5% (peso de lípido como agregado/peso de lípido total) agregado. Los agregados se pueden detectar y medir por métodos conocidos en la materia y como se describe en los Ejemplos a continuación, *por ejemplo*, por técnicas de dispersión cuasi-elástica de la luz (QELS) (*ver, por ejemplo*, Koppaka y otros (1996) Biochemistry 35: 7482-91). En modalidades particulares, un fosfolípido "soluble" comprende agregados no detectables.

50

55

En modalidades representativas, el fosfolípido soluble comprende, consiste esencialmente de, o consiste de fosfatidilserina (PS), fosfatidilhomoserina, fosfatidiletanolamina y/o ácido fosfatídico. El fosfolípido soluble comprende dos moléculas de ácidos grasos acilados, que pueden ser ácidos grasos de cadena corta, media o larga, o una mezcla

de éstos. Del mismo modo, los ácidos grasos pueden ser saturados, monoinsaturados poliinsaturados, o una mezcla de éstos. En general, los fosfolípidos que contienen ácidos grasos de cadena corta y media son ventajosos, ya que son menos propensos a formar agregados. Además, tal como se conoce en la materia, los ácidos grasos insaturados son menos propensos a formar estructuras de agregados. Por lo tanto, los ácidos grasos más insaturados se pueden emplear en la presente invención también. En modalidades representativas, el fosfolípido soluble comprende ácidos grasos acilados C2 a C14 o C16. En otras modalidades representativas el fosfolípido soluble comprende, consiste esencialmente de, o consiste de ácidos grasos acilados C4 a C10 o C12. En una modalidad particular, el fosfolípido soluble comprende, consiste esencialmente de, o consiste de C6 fosfatidilserina (es decir, 1,2-dicaproil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina; C6PS).

La concentración del fosfolípido soluble que se usa en los ensayos de la invención no es crítica siempre que el fosfolípido permanezca soluble (como se definió anteriormente) y sea lo suficientemente alta como para resultar en la ocupación de los sitios reguladores de las proteínas para las proteínas implicadas en un ensayo particular. El fosfolípido soluble se puede añadir en cualquier concentración adecuada que conserve la solubilidad del fosfolípido y active la cascada de la coagulación (o parte de ésta). En general, la concentración de fosfolípido está por debajo de la concentración micelar crítica, la cual se puede determinar por el uso de técnicas conocidas, tales como QELS (ver, por ejemplo, Koppaka, y otros (1996) *Biochemistry* 35:7482-91). En modalidades ilustrativas, el fosfolípido soluble se añade para conseguir una concentración final en la mezcla de reacción de al menos aproximadamente 1 μM , 2 μM , 4 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM o 100 μM y/o menor que aproximadamente 250 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 600 μM , 700 μM , 1 mM, 1,5 mM o 2 mM. Como se describió anteriormente y se entiende por aquellos con experiencia en la materia, el intervalo de concentración particular que mantendrá el fosfolípido en una forma soluble puede variar un poco en base al tipo de fosfolípido y la longitud y el grado de saturación de los ácidos grasos acilados, así como las condiciones de ensayo particular, y se puede determinar rutinariamente por aquellos con experiencia en la materia.

En modalidades particulares, el fosfolípido soluble se añade a la muestra como una solución acuosa. Como una alternativa, el fosfolípido soluble se añade a la muestra como una composición seca (por ejemplo, liofilizada). Este último enfoque puede ser ventajoso ya que la composición seca es más fácil de manejar y transportar y tiene una vida útil más larga. Las composiciones de fosfolípidos se pueden preparar por medio del uso de técnicas conocidas y están disponibles de una variedad de fuentes comerciales (por ejemplo, Avanti Polar Lipids Inc; Alabaster, AL).

Los fosfolípidos solubles de la invención son "funcionalmente equivalentes" a las membranas de plaquetas o a las preparaciones sintéticas de membrana en que ellos pueden sustituir a las membranas de plaquetas o a las preparaciones sintéticas de membrana en ensayos de coagulación u otros ensayos de actividad de coagulación y acelerar las reacciones activadas por fosfolípidos (por ejemplo, $\text{FX} \rightarrow \text{FX}_a$ o protrombina \rightarrow trombina). En modalidades particulares, los fosfolípidos solubles aceleran las reacciones activadas por fosfolípidos, con cinéticas similares como las preparaciones de membrana. En modalidades ejemplares, la constante de velocidad (es decir, k_{cat}/K_M) para la activación de la protrombina por un complejo de protrombinasa activado por el fosfolípido soluble es del orden de al menos aproximadamente 10^{-7} , 10^{-8} o $10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$.

Una ventaja sorprendente e inesperada de la presente invención es que se puede usar para llevar a cabo ensayos para evaluar la actividad de coagulación en muestras de sangre o plasma de sujetos con lupus o muestras que en otras circunstancias contienen factores anticoagulantes lúpicos. Los pacientes de lupus tienen anticoagulantes lúpicos circulantes, también conocidos como anticuerpos anti-fosfolípidos, en su sangre y plasma. Estos anticuerpos se unen a proteínas de unión a lípidos que pueden asociarse con las preparaciones de membranas sintéticas que se usan en los ensayos convencionales, por lo que interfieren con el ensayo. Paradójicamente, la presencia de anticoagulantes lúpicos resulta en un tiempo de coagulación prolongado debido a la retención de los fosfolípidos de la membrana, lo que interfiere con las vías dependientes de la membrana.

Así, un problema en la técnica es la falta de ensayos adecuados para evaluar la actividad de coagulación en pacientes con anticoagulantes lúpicos (ver, por ejemplo, Blanco y otros, (1997) *Thromb Haemost* 77:656-9; Nuss y otros, (1999) *Thromb Haemost* 82:1559-60; Ballard y otros, (1993) *Br J Rheumatol* 32:515-7; Saxena y otros, (1993) *Am J Hematol* 42:232-3; Biron y otros, (1996) *Am J Hematol* 51:250-1; Saxena y otros, (2000) *Haemophilia* 6:78-83; Triplett y otros, (1997) *Am J Hematol* 56: 195-6; Blanco y otros, (1998) *Am J Hematol* 58:248). Los fosfolípidos solubles de la presente invención no forman estructuras agregadas reconocidas por los anticoagulantes lúpicos y, así, reducir o eliminar la interferencia de ahí.

Ensayos de actividad de coagulación.

En una modalidad representativa, la invención proporciona un método de evaluación de la actividad de coagulación en una muestra de sangre o plasma que comprende: (a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con un fosfolípido soluble, un activador de contacto y calcio; (b) incubar esta mezcla durante un tiempo y bajo condiciones

suficientes para la activación de la trombina, y (c) detectar la variable de valoración adecuada, tal como la actividad de FX_a o la actividad de la trombina, en donde la actividad de FX_a o la actividad de la trombina es indicativa de la actividad de coagulación en la muestra.

- 5 En modalidades particulares, los métodos de la invención comprenden proporcionar una muestra de sangre o plasma y combinar la muestra con el activador de contacto e incubar esta mezcla para activar la muestra antes de la adición del calcio y el fosfolípido soluble. El fosfolípido soluble y el calcio se añaden después para iniciar la cascada de la coagulación.
- 10 Los términos "evaluar", "evalúa", y "evaluación" (y equivalentes gramaticales de éstos) de la actividad del factor de coagulación o la actividad de coagulación se pretende que abarquen ampliamente y evalúen cualquier deficiencia (*por ejemplo*, aumenta o disminuye) en la actividad, *por ejemplo*, en comparación con la actividad en una muestra o sujeto normal.
- 15 El término "actividad de coagulación" se usa también ampliamente para indicar la capacidad de la muestra para formar un coágulo. La variable de valoración detectada, sin embargo, no tiene que ser la formación de coágulos, aunque esto puede ser en modalidades particulares de la invención. Los ensayos de actividad de coagulación pueden ser ensayos de coagulación o, alternativamente, pueden evaluar la actividad de los factores de la coagulación individuales. Los ensayos para la evaluación de la actividad de coagulación también abarcan evaluaciones de los niveles basales de los factores de la coagulación activados, la presencia de factores inhibidores, la resistencia a los inhibidores de la vía de coagulación, o cualquier otra perturbación de la vía de coagulación normal.
- 20

Por "deficiencia" se entiende cualquier anomalía en la actividad de coagulación, la cual puede resultar de una deficiencia o elevación aberrante de la actividad del factor de coagulación. Por una "deficiencia" (y las variaciones gramaticales de éstas) en la actividad de coagulación, se quiere decir que la capacidad de una muestra o sujeto para formar un coágulo se reduce independientemente de la causa, *por ejemplo*, una disminución de la abundancia del factor de coagulación circulante, la deficiencia de la activación del factor de coagulación (*por ejemplo*, debido a la falta de agentes de activación o debido a anomalías en el propio factor de la coagulación), las mutaciones que resultan en la disminución de la actividad biológica del factor de coagulación, el aumento del recambio del factor de coagulación, la presencia de factores inhibidores (por ejemplo, los anticuerpos que se unen y neutralizan los factores de la coagulación, tales como FV, FVIII, FIX, FX y FXI, anticoagulantes lúpicos, *etc.*) y similares. De manera similar, una "elevación aberrante" (y las variaciones gramaticales de éstas) en la actividad del factor de coagulación se puede deber a mayores niveles del factor de coagulación circulante, la reducción del recambio del factor de coagulación, una mayor conversión del factor de coagulación inactivo al estado activado, las mutaciones que dan como resultado una mayor actividad del factor de coagulación, la reducción del nivel de, o la sensibilidad a las señales inhibitorias, y similares.

25

30

35

La actividad de la trombina se puede determinar por cualquier método adecuado. Por ejemplo, los ensayos cromogénicos y fluorescentes de actividad de la enzima trombina se conocen en la materia (*ver, por ejemplo*, Triscott, y otros (1999) *Thromb Haemost.*, (Suppl):. 379). Alternativamente, y típicamente más convenientemente, la actividad de la trombina se puede evaluar indirectamente mediante la detección de la formación de coágulos (discutido en más detalle a continuación).

40

Asimismo, los métodos de ensayo de la actividad de FX_a se conocen en la materia. Los ensayos típicos se basan en determinaciones cromogénicas o fluorescentes (*ver, por ejemplo*, Rosen y otros (1984) *Scand J. Haematol* 33 (Supl. 40): 139-145). Los ensayos comerciales adecuados y los reactivos están disponibles de Chromogenix (Milán, Italia). Las mediciones de la actividad de FX_a también se pueden usar como variable de valoración para evaluar otros factores de la coagulación, *por ejemplo*, FVIII_a (discutidos más abajo).

45

Se cree que el papel del activador de contacto en los ensayos de la vía intrínseca de la coagulación es la de mediar la activación de $FXII \rightarrow FXII_a$. Cualquier activador de contacto en la materia se puede usar en conexión con la presente invención, se incluyen los activadores de contacto químicos y particulados. Los ejemplos de activadores de contacto incluyen pero no se limitan al caolín, la arcilla, la sílice, la celita, la tierra de diatomeas, las perlas de vidrio, el ácido elágico, o las combinaciones de éstos. Los activadores basados en el ácido elágico que comprenden iones metálicos y fenol se describen en US 5.451.509. La longitud de tiempo de la activación de contacto no es crítica para la invención y será generalmente de aproximadamente de 2 a 5, 7 o 10 minutos.

50

55

El calcio se añade generalmente para iniciar la actividad de coagulación y se proporciona en una forma que produzca iones de calcio libres (por ejemplo, cloruro de calcio u otras sales de calcio) en la mezcla de reacción.

5 En algunas modalidades de la invención, otros cationes metálicos divalentes se usan en lugar de, o además de, el calcio para iniciar la actividad de coagulación. Los ejemplos de cationes metálicos divalentes incluyen magnesio, manganeso, bario y combinaciones de éstos. Como una alternativa adicional, el terbio (elemento 65) o el plomo se pueden emplear en combinación con o en lugar de los cationes metálicos divalentes anteriores para iniciar la actividad de coagulación.

10 La presente invención también abarca métodos de realización de ensayos de coagulación, en particular, los ensayos para evaluar la coagulación a través de la vía intrínseca de la coagulación. En una modalidad representativa, el método comprende: la combinación de una muestra que comprende sangre o plasma con un fosfolípido soluble, un activador de contacto y calcio. La mezcla se incuba durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación del coágulo. En modalidades particulares, la mezcla de reacción se agita antes de la incubación. Aquellos con experiencia en la materia apreciarán que en una muestra que tiene un defecto en la vía de coagulación, *por ejemplo*, existe una deficiencia en la actividad en uno de los factores de la coagulación o hay un alto nivel aberrante en un factor inhibitorio, se reducirá o incluso no habrá formación de coágulo. Adicionalmente, las deficiencias de factores de la coagulación pueden dar lugar a la formación del coágulo anormal, *por ejemplo*, coágulos acuosos o delgados. En contraste, en los estados de hipercoagulabilidad, hay una mayor propensión a la formación de coágulos, que pueden manifestarse como anormalmente rápido tiempo de coagulación o de alta actividad del factor de coagulación, incluso en presencia de factores de inhibición o en ausencia de estímulos de la vía de coagulación (*por ejemplo*, el factor tisular).

20 El ensayo clínico estándar para la actividad de la vía de coagulación intrínseca es la prueba de tiempo de la tromboplastina parcial activada (APTT). En general, las pruebas convencionales de APTT se llevan a cabo mediante la incubación de una muestra de plasma tratado previamente con citrato u otro anticoagulante con un activador de contacto particulado o químico para activar FXII → FXII_a (**Figura 1**). Después de un período de activación (*por ejemplo*, 2-7 minutos) un sustituto sintético de las membranas de plaquetas y los iones de calcio se añaden a la muestra para iniciar la coagulación.

Las variaciones en el ensayo de APTT que usan sangre total se han descrito (*ver, por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 5.039.617 y 5.091.304 que enseñan ensayos APTT de sangre total modificados).

30 Otro ensayo de coagulación es el tiempo de coagulación de la sangre total activada (AWBCT). Típicamente, el AWBCT se lleva a cabo mediante la mezcla de una muestra de sangre total con un activador de contacto particulado o químico. La muestra luego se calienta y se agita y se controla la coagulación.

35 Se conoce el intervalo normal de los tiempos de coagulación para los ensayos particulares, y los métodos para determinar un tiempo de coagulación prolongado o anormalmente rápido sería evidente para aquellos con experiencia en la materia. Los tiempos de coagulación normales son típicamente del orden de 20-35 segundos, sin embargo, aquellos con experiencia en la materia entenderán que el tiempo de coagulación "normal" puede ser más corto o más largo con diferentes concentraciones de los reactivos, tales como los fosfolípidos solubles, y otras variaciones en las condiciones del ensayo. Los métodos de normalización de los ensayos de coagulación se discuten a continuación.

40 **Métodos para identificar defectos en la vía de coagulación.**

45 Los métodos de la invención son adecuados para uso en relación a cualquier ensayo que evalúa la actividad de la vía intrínseca de la coagulación o de las vías dentro de la cascada de la coagulación que requieren fosfolípidos (tradicionalmente proporcionados en forma de membranas de plaquetas o composiciones de membranas sintéticas). Las deficiencias en los factores de la coagulación están asociadas con diversas formas de hemofilia (*por ejemplo*, deficiencias en FVIII, FIX y FXI). En contraste, las anomalías que resultan en una elevación anormal en la actividad de coagulación están asociadas con un riesgo aumentado de trombosis (*por ejemplo*, deficiencias en la actividad antitrombina, la actividad de la proteína C, la actividad de la Proteína S o la actividad de FXII, la resistencia de la proteína C activada, la mutación de FV_{Leiden}, la elevada actividad de FVIII, las mutantes de la trombomodulina, *etc.*).

50 Generalmente, la primera evaluación de la actividad del factor de coagulación es un ensayo de coagulación tal como el APTT que se afectará por una amplia gama de anomalías. El APTT, sin embargo, sólo indicará que hay deficiencia en la vía de la coagulación. Otros ensayos pueden llevarse a cabo para identificar más específicamente el defecto.

55 Los métodos de la invención se pueden practicar para detectar alteraciones (*por ejemplo*, deficiencias) en la vía intrínseca de la coagulación. En una modalidad representativa, la invención proporciona un método de detección de una deficiencia en la actividad de coagulación que comprende: (a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con un fosfolípido soluble, un activador de contacto, y calcio; (b) incubar esta mezcla durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación del coágulo; (c) determinar un tiempo de coagulación de la muestra, y (d)

comparar el tiempo de coagulación determinado para la muestra con un patrón, donde un tiempo de coagulación prolongado en comparación con el patrón es indicativo de una deficiencia en la actividad de la vía intrínseca de la coagulación. Alternativamente, otras variables de valoración, tales como la actividad de la enzima trombina o la actividad de FX_a se pueden detectar.

5

Una vez que se ha identificado una deficiencia de coagulación, es común el seguimiento con una "prueba de mezcla." Típicamente, el plasma de prueba se mezcla 1:1 con plasma normal y se repite la prueba de coagulación (u otra prueba adecuada de la actividad de coagulación). Si la prueba de coagulación proporciona un resultado normal, esto típicamente indica que una deficiencia del factor de coagulación es la causa subyacente. En contraste, en general requerirá de dilución adicional para revertir los efectos de un factor inhibidor.

10

Si se sospecha una deficiencia del factor de coagulación, los métodos de la invención se pueden usar para llevar a cabo estudios de mezclas adicionales para evaluar e identificar la deficiencia específica del factor de coagulación. Por ejemplo, la muestra de prueba de coagulación defectuosa se puede combinar con el plasma de referencia que tiene una deficiencia conocida en un determinado factor de coagulación (s). Los plasmas con déficit de factores específicos están disponibles comercialmente. Si la muestra de prueba de coagulación defectuosa puede compensar la deficiencia conocida en el plasma de referencia, esto es una indicación de que este factor particular está presente en la muestra de prueba. Si la combinación con el plasma de referencia no restaura la coagulación, entonces, el mismo factor es deficiente en la muestra de prueba y el plasma de referencia. En una variación de este enfoque, los factores de la coagulación purificados se pueden añadir a la muestra de prueba antes del ensayo de coagulación. Para ilustrar, el FVIII se puede añadir a una muestra de prueba de coagulación defectuosa. Si la adición del factor exógeno restaura la actividad normal de coagulación, entonces, se puede presumir que la muestra de prueba tiene una deficiencia en la actividad de FVIII. Estos métodos se pueden practicar para identificar una deficiencia en la actividad de cualquiera de los factores de la coagulación implicados en la vía intrínseca, *por ejemplo*, el FI (*es decir*, la fibrina), el FII (*es decir*, la trombina), FV, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII. En particular, la invención es útil para la detección de deficiencias de FVIII_a, FIX_a y FXI_a, que son las deficiencias más comunes y están asociadas con las hemofilias A, B y C, respectivamente.

15

20

25

El nivel de actividad del factor de coagulación en la muestra de prueba se puede determinar adicionalmente por comparación con una curva patrón generada mediante la preparación de un intervalo de diluciones de plasma normal con plasma deficiente del factor y determinar un tiempo de coagulación para cada uno. El tiempo de coagulación de la muestra se puede comparar con la curva patrón para determinar qué % del factor de coagulación está presente en la muestra de prueba en comparación con el plasma normal.

30

La presente invención también abarca métodos de evaluación de la actividad de un factor de coagulación de la vía intrínseca de la coagulación (FV, FVIII, FIX y FX), que incluye factores de la coagulación dependientes de fosfolípidos (*por ejemplo*, un factor de coagulación que requiere las membranas de plaquetas o las membranas sintéticas para la activación o la actividad). Por ejemplo, un ensayo corriente es un ensayo cromogénico del FVIII_a que se usa para identificar específicamente la deficiencia del FVIII_a, que se asocia con la hemofilia A. Los ensayos comerciales basados en la detección cromogénica de FVIII_a están disponibles de Chromogenix (Milán, Italia), tales como la prueba Coatest® VIII: C/4. De acuerdo con la presente invención, el FIX_a exógeno, el FX exógeno y los fosfolípidos solubles se combinan con una muestra de plasma. En presencia de FVIII_a en la muestra de plasma, el FX se activará a FX_a. La actividad del FX_a se puede detectar por medio del uso de técnicas conocidas (*ver, por ejemplo*, Rosen, y otros (1984) Scand J. Haematol33 (Supl.40): 139-145). Alternativamente, se puede detectar la actividad enzimática de la trombina o la formación de coágulos. En una variación del ensayo Chromogenix, se pueden agregar al sistema pequeñas cantidades de trombina para activar FVIII → FVIII_a.

35

40

45

Se pueden usar ensayos similares para evaluar la actividad de otros factores de la coagulación dependientes de fosfolípidos. Por ejemplo, el FVIII_a (o el FVIII y un activador del factor VIII), en lugar del FIX_a, se puede añadir al sistema descrito anteriormente para evaluar la actividad del FIX_a en la muestra. Para evaluar la actividad de FX_a en la muestra de plasma, el FVIII_a (o el FVIII y un activador de FVIII_a) y FIX_a se pueden añadir al plasma y el FX_a o la actividad de la trombina (*por ejemplo*, mediante la detección de la actividad enzimática de trombina o la formación de coágulos) se evaluaron. Este sistema de ensayo depende del plasma para proporcionar el factor de coagulación que se evalúa para iniciar la cascada de la coagulación. Si existe una deficiencia en la coagulación (o se detecta cualquier otra variable), se puede inferir que la muestra era deficiente para el factor particular evaluado, ya que todos los otros componentes necesarios se proporcionan al sistema de ensayo. En otras palabras, se proporcionan todos los factores, excepto el factor evaluado, el cual sería necesario para la actividad de la vía de coagulación. Por lo tanto, si hay una deficiencia en la actividad del factor de coagulación se puede atribuir a una deficiencia en el factor evaluado ya que todos los otros factores necesarios se proporcionan.

50

55

60

Por lo tanto, la invención proporciona métodos de evaluación de la actividad de un factor de coagulación de la vía

intrínseca de la coagulación que comprende: (a) combinar una muestra que comprende plasma con: un fosfolípido soluble, el factor X exógeno y las formas activadas de los factores de la coagulación distintos de FX que dependen del factor de coagulación que se evalúa en la vía intrínseca de la coagulación o se requiere para la activación del factor de coagulación que se evalúa, y calcio; (b) incubar esta mezcla durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación del factor X a factor X_a, y (c) detectar la actividad del factor X_a, donde la actividad del factor X_a es indicativa de la actividad del factor de coagulación en la muestra. La actividad del FX_a se puede evaluar directamente (*por ejemplo*, mediante un ensayo cromogénico o fluorescente) o se puede evaluar indirectamente mediante la detección de la actividad enzimática de la trombina o la formación de coágulos.

La invención también se puede usar en los métodos de detección y/o identificación de los factores inhibidores. Los factores inhibidores incluyen inhibidores del factor de coagulación (*es decir*, los anticuerpos que neutralizan los factores de la coagulación), la heparina y los anticoagulantes lúpicos.

Los métodos de la invención se pueden usar para identificar, y opcionalmente cuantificar, los autoanticuerpos (a veces denominados inhibidores) de los factores de la coagulación (*por ejemplo*, los autoanticuerpos a FV, FVIII, FIX, FX o FXI). El título de estos inhibidores en la muestra o sujeto se llama un "título de Bethesda" (Ewing & Kasper, (1982) Am. J. Clin. Pathol. 77:749-52). Los bajos títulos de Bethesda se pueden tratar mediante la administración de cantidades excesivas del factor de la coagulación contra los que se dirige el autoanticuerpo para superar los efectos inhibidores. Los altos títulos de Bethesda generalmente no se pueden tratar con este enfoque. Los ensayos para determinar los títulos de Bethesda se basan en pruebas de mezcla que implican la determinación de cuánto se tiene que diluir un plasma de prueba que contiene inhibidores en el plasma normal para reducir el tiempo de coagulación a la normalidad. En un ensayo estándar, diversas diluciones de plasma de prueba con plasma normal se incuban a 37°C durante 2 horas. El título del inhibidor es el recíproco de la dilución del plasma de prueba que contiene el inhibidor que neutraliza 50% de la actividad normal del factor de coagulación. Estos ensayos se pueden usar adicionalmente para controlar la terapia de reemplazo del factor de coagulación para determinar si los pacientes reciben suficiente factor de coagulación.

Con respecto a los anticoagulantes lúpicos, la invención se puede usar en los métodos de identificación de la presencia de anticoagulantes lúpicos en comparación con otros factores inhibidores. Por ejemplo, un ensayo de coagulación o FX_a se puede llevar a cabo en presencia de los fosfolípidos solubles y las preparaciones de membrana sintética. Un tiempo de coagulación prolongado o la baja actividad de FX_a en presencia de membranas sintéticas con un tiempo de coagulación o la actividad de FX_a con los fosfolípidos solubles normal, indica la presencia de anticoagulantes lúpicos en la muestra.

Ensayos de resistencia a la APC.

Los métodos de la invención también se pueden usar para evaluar elevaciones anormales en la actividad de coagulación (*es decir*, estados de hipercoagulabilidad).

Para ilustrar, como otra aplicación, los fosfolípidos solubles de la presente invención se pueden usar en relación con los ensayos de la proteína C activada (APC), los cuales evalúan la resistencia a los efectos anti-coagulantes de la proteína C. La proteína C evita la coagulación incontrolada y la migración de los factores de la coagulación de la sangre activados desde el sitio de la lesión vascular. La trombina que escapa del sitio de la hemostasia se unirá a la tromboomodulina, un receptor unido a las células, el cual reduce la actividad procoagulante de la trombina (*es decir*, la capacidad para convertir fibrinógeno → fibrina). Esta interacción entre la trombina y la tromboomodulina también modula la actividad de la trombina para convertirla en un activador específico del zimógeno de la proteína C. La proteína C activada (APC) es una proteasa de serina que, en presencia de la Proteína S, inactiva FV_a y FVIII_a, por lo tanto disminuye notablemente la cascada de la coagulación.

Algunos individuos tienen deficiencias en la capacidad de la APC para inactivar el FV_a y se denominan "resistente a APC." Dichos sujetos están en mayor riesgo de trombosis. La resistencia a la APC se puede deber a deficiencias hereditarias o adquiridas en la actividad normal de la Proteína C o de la Proteína S. La forma más frecuente de resistencia a la APC es un resultado de una mutación específica en FV (mutación de Arg⁵⁰⁶ → Gln⁵⁰⁶) que produce una forma de FV resistente a la APC que se denomina "FV_{Leiden}."

La adición de la APC al plasma o la sangre de sujetos normales resulta en una ralentización del proceso de coagulación y un prolongado tiempo de coagulación (resultados alternativos incluyen la reducción de la actividad enzimática de la trombina o la actividad FX_a reducida, *etc.*). La resistencia a la APC se manifiesta como una alteración en esta vía inhibitoria, con coagulación rápida y continua (o, alternativamente, de alta actividad enzimática de trombina, alta actividad de FX_a, *etc.*).

Los ensayos de resistencia a la APC se conocen en la materia, e incluyen los ensayos descritos en las publicaciones de las solicitudes internacionales de patente WO 93/10261 y WO 96/04560, la patente de Estados Unidos núm. 6.426.192 y Dahlback, y otros (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. 90:1004-08. Los kits de ensayo y reactivos adecuados comerciales están también disponibles de Chromogenix (Milán, Italia), tales como el ensayo de resistencia Coatest® APC™. Los ensayos existentes, que se basan en preparaciones de membranas sintéticas, son relativamente poco fiables. Por ejemplo, estos ensayos no son lo suficientemente sensibles y reproducibles para identificar con precisión los individuos heterocigotos de FV_{Leiden}, los cuales típicamente presentan menos resistencia a la APC que los individuos homocigotos. El uso de los fosfolípidos solubles en lugar de las preparaciones de membranas sintéticas puede aumentar la reproducibilidad del ensayo y permitir una mejor discriminación entre los individuos heterocigotos y normales.

En una modalidad representativa de la presente invención, el ensayo de resistencia a la APC comprende: (a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con un fosfolípido soluble, un activador de contacto, calcio y APC o un activador de la Proteína C; (b) incubar esta mezcla durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación de la trombina, y (c) detectar la actividad de la trombina, en donde la actividad de la trombina es indicativa de la resistencia a la APC. La actividad de la trombina se puede medir directamente o por la formación de coágulos. En modalidades particulares, el activador de contacto y los fosfolípidos se añaden primero, y después de la activación por contacto, la APC o el activador de la proteína C y el calcio se añaden para iniciar la cascada de la coagulación. Adicionalmente, muchos ensayos existentes diluyen el plasma de prueba con plasma deficiente en FV antes del ensayo (por ejemplo, una parte de plasma de ensayo: 4 a 20 partes de plasma deficiente en FV), de esta manera se aumenta la sensibilidad del ensayo a concentraciones de FV_a. Estas modificaciones también se pueden combinar con los métodos de la invención.

Cualquier variable de valoración que indique el nivel de FV_a conocido en la materia se puede usar en el ensayo de resistencia a la APC, que incluye pero no se limita a la medición directa de la actividad de FV_a, la actividad de FX_a, la actividad enzimática de la trombina y la detección de la formación de coágulos. Recientemente, un ensayo cromogénico de APC se ha descrito en el cual se añade el FX_a al plasma diluido en presencia de calcio, fosfolípidos y APC o un activador de la Proteína C. La variable de valoración medida es la hidrólisis de un sustrato cromogénico por trombina. La resistencia a la APC impedirá la velocidad de inactivación de FV_a por la APC y dará lugar a mayores niveles de generación de trombina en comparación con el plasma normal.

La resistencia a la APC se puede determinar por comparación con un patrón, tal como el plasma normal o valores que se basan en la información clínica histórica (como se describe a continuación). El enfoque más común, sin embargo, es determinar una relación de tiempo de coagulación (u otra variable de valoración adecuada, tal como la actividad de la trombina o la actividad FX_a) en presencia y en ausencia de la APC. Las proporciones típicas de coagulación de la APC (tiempo de coagulación con APC/tiempo de coagulación sin APC) para sujetos sanos están en el intervalo de aproximadamente 2-5, y son menor que aproximadamente 2 para los individuos resistentes a la APC (por ejemplo, los valores de aproximadamente 1,4 a 1,8 para los heterocigotos FV_{Leiden} y aproximadamente de 1,1 – 1,3 para los homocigotos FV_{Leiden}). Un ensayo comercial (el ensayo Coatest® APC™, Chromogenix recomienda un valor de corte de la resistencia a la APC de 0,75 a 0,80 veces la relación de APC mediana para el plasma normal.

La trombina en presencia de trombomodulina es un activador de la Proteína C. Otros activadores de la Proteína C se conocen en la materia e incluyen extractos de veneno de serpiente y fracciones purificadas a partir de veneno de serpiente. Los venenos de serpientes ilustrativos que contienen activadores de la Proteína C incluyen venenos de *Agkistrodon contortrix contortrix* o de especies de Elapidae tales como *Notechis*, *Tropidechis*, *Crptophys*, *Hoplocephalus* y *Pseudechis* (por ejemplo, *Notechis scutatus scutatus*, *Notechis ater niger*, *Notechis ater humphreysi*, *Notechis ater serventyi*, *Notechis flinders*, *Notechis occidentalis*, *Tropidechis carinatus*, *Cryptophys nigrescens*, *Hoplocephalus stephensii* y *Pseudechis porphyriacus*). Los factores de activación a partir de veneno de serpiente también se pueden producir por medio del uso de técnicas recombinantes de ácidos nucleicos, por ejemplo, a partir de microorganismos, cultivos de células de insectos, cultivos de células de mamíferos y similares.

El Protac® (American Diagnostica, Greenwich, CT) es una proteasa de serina y activador de la Proteína C que se aísla y purifica a partir del veneno de la serpiente cabeza de cobre del sur (*Agkistrodon contortrix contortrix*).

Otra causa de resistencia a la APC es una deficiencia en la actividad de la Proteína S (por ejemplo, debido a reducciones en la abundancia de la Proteína S, la actividad biológica de la proteína, o la presencia de inhibidores). La Proteína S es el cofactor de la APC. Si bien existe cierto desacuerdo en la literatura acerca de cuánto contribuye la velocidad de aumento de la Proteína S a la actividad proteolítica de la APC, es evidente que su efecto de mejora de la velocidad requiere membranas que contengan PS (Norstrom y otros, (2003) J. Biol. Chem.278:24904). Los kits comerciales para la detección de la actividad de la Proteína S están disponibles en American Diagnostica (Greenwich, CT). En un ensayo representativo de la Proteína S que se puede modificar para su uso con los fosfolípidos solubles de

la invención, el plasma de prueba se diluye con plasma empobrecido en Proteína S. Un reactivo que contiene el FX_a, APC y el fosfolípido soluble se combina luego con el plasma mezclado y se añade el calcio para iniciar la formación de coágulos. El plasma normal, pero no el plasma con una deficiencia de Proteína S, corregirá la resistencia a la APC en el plasma empobrecido en Proteína S. La prolongación del tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de la Proteína S en el plasma de prueba, el cual se puede comparar con una curva estándar. Como alternativa, los ensayos de la Proteína S se pueden llevar a cabo como una variación de los ensayos de la APC descritos anteriormente, con la excepción de que el plasma de prueba se diluye con plasma empobrecido en Proteína S.

Niveles elevados del factor VII_a.

Otra alteración reconocida en la actividad de coagulación es un resultado de elevaciones anormales en los niveles basales del FVII_a. Como otro ejemplo de cómo la presente invención se puede usar en la evaluación de la actividad de coagulación, la SPS se puede sustituir por las membranas que contienen PS en ensayos para la actividad del factor VII_a. El FVII se convierte en FVII_a en presencia del factor tisular (TF), el cual también actúa como un potente cofactor de la actividad del FVII_a. En particular, el FVII_a en presencia del TF activa FX → FX_a. Algunos individuos tienen un mayor nivel basal de FVII_a (*es decir*, en ausencia de TF o daño tisular) y parecen estar en un mayor riesgo de trombosis. El TF está generalmente incrustado dentro de las membranas y se cree que el TF asociado a la membrana se requiere para la activación de FVII a FVII_a, pero no como un cofactor de la activación de FVII_a en FX (*es decir*, un TF soluble puede actuar como un cofactor de FVII_a).

Los métodos de detección y, opcionalmente, la cuantificación de los niveles de FVII_a se conocen en la materia (*ver, por ejemplo*, Morrissey, y otros (1993) Blood 81:734; Kapur, y otros (1996) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 16, 1327-1332), y se puede modificar para incorporar los fosfolípidos solubles de la presente invención en lugar de las preparaciones de membranas sintéticas.

Un método representativo para evaluar la actividad de FVII_a de acuerdo con la invención comprende: (a) combinar una muestra que comprende plasma con un fosfolípido soluble, el factor tisular soluble y calcio; (b) incubar esta mezcla durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación del FX_a o de la trombina y (c) detectar la actividad de FX_a o la actividad de la trombina (*por ejemplo*, mediante el ensayo enzimático o la formación de coágulos), en donde la actividad de FX_a o la actividad de la trombina es indicativa de la actividad del factor VII_a en la muestra. Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría de la invención, en presencia del TF soluble, el FVII no se activará a FVII_a. Por lo tanto, el ensayo evalúa los niveles basales de FVII_a. El TF soluble acelera la activación de FVII_a de FX en presencia de fosfolípido soluble. Cualquier variable de valoración adecuada se puede detectar, por ejemplo, la actividad de FX_a, la actividad de la enzima trombina o la formación de coágulos. En presencia de elevados niveles de FVII_a en comparación con el plasma normal, habrá un aumento de la actividad de FX_a, aumento de la actividad de la enzima trombina o un tiempo de coagulación más rápido en comparación con el plasma normal.

El factor tisular soluble (*por ejemplo*, no asociado a la membrana) se puede preparar por cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, el TF se puede solubilizar por tratamiento de las membranas que contienen TF con un detergente. En este caso, se puede esperar que la SPS se asocie con las micelas de detergente. Alternativamente, el TF se puede trincar de manera que la parte asociada a la membrana se retira (*ver, por ejemplo*, Morrissey, y otros (1993) Blood 81:734; patentes de Estados Unidos núms. 5.750.358; 5.741.658).

Control de los sujetos antes de la cirugía y/o después de la terapia de anti-coagulación.

Los métodos de la invención también se pueden usar para evaluar la actividad de coagulación en un sujeto antes de la cirugía. Alternativamente, los métodos se pueden practicar para controlar el tiempo de coagulación después de la terapia anticoagulante (*por ejemplo*, la terapia de heparina antes de o durante la cirugía). En una modalidad representativa, el método comprende: (a) obtener una muestra que comprende sangre o plasma de un sujeto que se le dio terapia anticoagulante (*por ejemplo*, heparina); (b) combinar la muestra con un fosfolípido soluble, un activador de contacto, y calcio; (c) incubar esta mezcla durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de coágulos; (d) determinar un tiempo de coagulación de la muestra, para controlar de este modo el tiempo de coagulación en el sujeto después del tratamiento con heparina. Alternativamente, se pueden supervisar otras variables de valoración, tales como la actividad de la enzima trombina o la actividad de FX_a.

El ensayo se puede realizar una o más veces adicionales para controlar el sujeto en el tiempo. Por ejemplo, se pueden tomar muestras del sujeto a intervalos de tiempo (*por ejemplo*, desde minutos, horas o incluso días) para seguir o controlar los efectos de la terapia anticoagulante en el tiempo.

En la materia anterior los métodos de evaluación de la actividad de la vía de coagulación intrínseca dependen de membranas de plaquetas o, más comúnmente, sustitutos de la membrana sintética. En contraste, la presente invención

usa fosfolípidos solubles en lugar de las membranas de plaquetas o las preparaciones sintéticas de membrana. Los ensayos de coagulación convencionales basados en membranas han sufrido una serie de inconvenientes, que incluyen un fondo elevado, variabilidad, dificultad en la producción de alta calidad y lotes reproducibles de membranas sintéticas, y la vida útil de estas preparaciones relativamente corta (*es decir*, inestabilidad).

5

En contraste, los ensayos que incorporan las composiciones de fosfolípidos solubles de la invención pueden tener un fondo inferior y ser más reproducibles. Además, las composiciones de fosfolípidos solubles son más fáciles y menos costosas de preparar, con variabilidad de lote a lote reducida, y tienen una vida útil más larga a temperatura ambiente, condiciones de refrigeración o congelación. En modalidades particulares, el fosfolípido soluble en forma seca tiene una vida útil de al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12 o 18 meses o más tiempo en condiciones de refrigeración (*por ejemplo*, alrededor de -4°C) o en el congelador (*por ejemplo*, -20°C). En otras modalidades, la estabilidad del fosfolípido seco soluble a temperatura ambiente es al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 o 9 meses o más. Los fosfolípidos secos se pueden solubilizar fácilmente, *por ejemplo*, en agua u otra solución acuosa, y almacenar extremadamente bien cuando se almacenan como un polvo seco.

10

15

Muestras y condiciones de ensayo.

Cualquier muestra adecuada se puede usar para llevar a cabo los métodos de la invención, típicamente una muestra de sangre o plasma pobre en plaquetas (PPP), en dependencia del ensayo particular que se usa. En modalidades representativas, la muestra se mezcla con un anticoagulante (*por ejemplo*, una sal de citrato tal como el citrato de sodio) para prevenir la coagulación antes de la iniciación del ensayo. La muestra se puede obtener de cualquier sujeto mamífero o aviar. Los sujetos mamíferos adecuados incluyen humanos, primates no humanos, gatos, perros, caballos, conejos, ratas, ratones, hámsters, cobayas, ovejas, cabras, vacas y cerdos. Los sujetos aviares adecuados incluyen pollos, pavos, codornices, patos, gansos, loros y pericos.

20

25

Como se indicó anteriormente, numerosos ensayos se conocen en la materia para evaluar la actividad de la vía intrínseca de la coagulación. Estos ensayos se pueden modificar para incorporar los fosfolípidos solubles de la invención en lugar de preparaciones de membranas de plaquetas o de membranas sintéticas. Así, las condiciones de reacción adecuadas (*por ejemplo*, tiempo y temperatura) para los ensayos de actividad de coagulación se conocen bien en la materia. Típicamente, los ensayos se llevan a cabo a temperatura ambiente o temperatura fisiológica (*por ejemplo*, 37°C).

30

Como se discutió anteriormente, los métodos de la invención se pueden practicar para llevar a cabo un ensayo de coagulación. En modalidades representativas de este aspecto de la invención, se determina para la muestra un tiempo de coagulación, *por ejemplo*, la cantidad de tiempo para que se forme un coágulo sólido. Alternativamente, o adicionalmente, el método se lleva a cabo para proporcionar una evaluación cualitativa del coágulo. Las muestras normales producen un coágulo de gel fuerte. Las muestras que producen coágulos delgados, acuosos o webby o con tiempos de coagulación prolongados indican una anomalía de la coagulación.

35

Detección de la formación de coágulos.

Se conocen una variedad de técnicas y dispositivos de detección para detectar la formación de coágulos. Generalmente, la mayoría de estos protocolos y dispositivos se basan en la detección del aumento de la turbidez o la viscosidad de la muestra. La inspección visual con el ojo humano (con o sin un microscopio u otro instrumento de aumento) también se puede usar para detectar la formación de coágulos. Los instrumentos automatizados típicamente controlan las propiedades ópticas, las propiedades mecánicas o la conductividad eléctrica. Por ejemplo, un enfoque tradicional emplea un instrumento que mide la conductividad creciente durante la formación del coágulo. Los fibrómetros son instrumentos que mecánicamente detectan la formación de coágulos como un aumento de la viscosidad de la muestra. Asimismo, la turbidez se puede detectar ópticamente por la disminución de la transmisión de luz a través de la muestra debido a la formación de coágulos.

40

45

Los instrumentos más avanzados, tales como la KoaguLab® (Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ), generan un gráfico impreso del trazado de la turbidez contra el tiempo de reacción. La forma de la curva proporciona una "firma del coágulo", que los médicos pueden evaluar. El Hemochron® (International Technidyne Corp., Edison, NJ; ver, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 3.836.333 y 3.695.842) o el analizador de coagulación Sigma Amelung AMAX CS-190® también se puede usar para determinar el tiempo de coagulación. En la materia se conocen otros instrumentos para la detección de la coagulación y la medición de los tiempos de coagulación.

50

55

En la materia también se conocen dispositivos y métodos para calcular la tasa o velocidad de formación del coágulo (*ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 5.169.786).

Métodos estandarizados.

En algunas modalidades de la invención, la actividad de coagulación deficiente se determina por comparación con un patrón. Por ejemplo, en base a la experiencia histórica con el ensayo, se puede seleccionar un valor umbral como un valor de referencia para la comparación con la actividad de coagulación en la muestra de prueba. Por ejemplo, un tiempo de coagulación en la muestra de prueba que es mayor que el valor de referencia o es mayor que el valor de referencia en una cantidad especificada (por ejemplo, al menos aproximadamente 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25 %, 30%, 40% o 50% o incluso mayor de dos veces o tres veces o más) presuntamente identifica la muestra como que tiene una deficiencia en la actividad de coagulación. Alternativamente, la reducción de la actividad de cada uno de los factores de la coagulación de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 33%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% o más se puede usar para identificar una muestra de prueba como que tiene una deficiencia en la actividad de coagulación. El análisis estadístico también se puede usar para identificar los valores de tiempo del ensayo que son significativamente mayores o menores que el valor de referencia. Típicamente, el valor de referencia se basa en valores de ensayo conocidos en muestras procedentes de sujetos sanos.

Un sistema para la normalización de los tiempos de coagulación es el Cociente Internacional Normalizado (INR). El plasma normal dará un valor de INR de 1. Los valores mayores que un cociente particular presuntamente identifica un sujeto que tiene una deficiencia en la actividad de coagulación. Por ejemplo, un valor de INR mayor que aproximadamente 1,05, 1,07, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,33, 1,4, 1,5, 1,75, 2,0 o 3 o mayor se puede usar para identificar sujetos con deficiencias de la coagulación.

La elección del valor de referencia se puede basar en un número de factores, que incluyen la experiencia clínica pasada, la reproducibilidad de los ensayos, la tolerancia de resultados falsos negativos o falsos positivos, el coste-beneficio del diagnóstico precoz, y similares.

Del mismo modo, se puede usar un patrón para determinar los tiempos de coagulación anormalmente rápidos o la actividad del factor de coagulación anormalmente elevada.

En algunos enfoques, el valor de referencia se determina al mismo tiempo por medio del uso de una muestra(s) de un sujeto normal(es) o una composición sintética que se sabe que proporciona valores de ensayo que son similares a los de la sangre normal o del plasma como un patrón. Por "concurrentemente" no es necesario que las muestras se analicen al mismo tiempo. "Concurrentemente" indica que del patrón y la muestra de prueba se analizan la dosis de tiempo suficiente tal que se puede hacer una comparación significativa entre la muestra y el patrón.

Las normas recomendadas para identificar muestras con la actividad de coagulación deficiente se proporcionan típicamente por el fabricante de los ensayos y los dispositivos comerciales.

Composiciones de ensayo

Como un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones de ensayo (*por ejemplo*, mezclas de reactivos) para llevar a cabo los métodos de la invención. En modalidades representativas, una composición de ensayo de acuerdo con la invención comprende: (a) una muestra de plasma; (b) un fosfolípido que es soluble en la muestra, (c) un reactivo adicional seleccionado de un activador de contacto, un factor tisular soluble y el factor X exógeno, y (d) calcio. En modalidades particulares, la composición de ensayo no contiene membranas de plaquetas o membranas sintéticas añadidas exógenamente. En otras modalidades particulares, la composición de ensayo anterior comprende un activador de contacto y adicionalmente comprende la Proteína C activada o un activador de la Proteína C. En aún otras modalidades, la composición de ensayo anterior comprende el Factor X exógeno y el factor IX_a exógeno. La composición de ensayo puede adicionalmente comprender un plasma deficiente en factor de coagulación o un plasma deficiente en Proteína C o Proteína S.

Un kit ilustrativo para practicar los métodos de la invención comprende: un fosfolípido soluble como se discutió anteriormente un reactivo adicional, tal como un activador de contacto, un factor tisular soluble y/o una composición que comprende el factor X. El kit puede adicionalmente comprender un reactivo de calcio, los factores de la coagulación exógenos en forma activada o inactiva, el plasma deficiente en el factor de coagulación, el plasma empobrecido en la Proteína S o la Proteína C, y/o un patrón adecuado. En una modalidad representativa, el kit anterior comprende un activador de contacto y adicionalmente comprende la Proteína C activada o un activador de la Proteína C. En otras modalidades, el kit anterior comprende una composición que comprende el Factor X y una composición que comprende el Factor IX_a, que se puede proporcionar de forma separada o como un solo reactivo.

El kit puede adicionalmente comprender otros reactivos tales como enzimas, sales, tampones, detergentes y similares para llevar a cabo los métodos de la invención. Los componentes del kit se envasan juntos en un envase común, que típicamente incluye instrucciones para realizar determinadas modalidades específicas de los métodos descritos en la presente.

Ejemplos

Los Ejemplos que siguen se exponen para ilustrar la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ésta. En los ejemplos, DAPA significa dansil arginina-N-(3-etil-1, 5-pentanodilo) amida; SDS-PAGE significa electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio; S-2238 significa HD-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-*p*-nitroanilida dihidrocloruro; S-2765 significa N- α -benciloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-*p*-nitroanilida dihidrocloruro; DOPC significa 1,2-dioleoil-3-sn-fosfatidilcolina; C6PS significa 1, 2-dicaproil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina; Pre2 significa pretrombina 2; II_a significa trombina; MzII_a significa meizotrombina, y F1.2 significa fragmento 1.2.

10 Dos reacciones clave de la coagulación sanguínea, la activación del factor X y de la protrombina, requieren membranas. *In vivo*, estas membranas son pequeñas vesículas liberadas por las plaquetas activadas que contienen un lípido cargado negativamente, la fosfatidilserina (PS) (Bode, y otros (1985) Thrombosis Res. 39 49; Jones, y otros (1985) Thrombosis Res. 39 711; Sims y otros (1988) J. Biol. Chem.263:18205). Estas dos reacciones involucran enzimas altamente homólogas y cofactores, a saber, los factores IX_a y VIII_a en la activación del factor X, y X_a y V_a en la activación de la protrombina. En el Ejemplo 1, se muestra que un complejo activador de la protrombina humana completamente activo, la protrombinasa, se puede ensamblar en solución por medio del uso de SPS y no requiere una superficie de cualquier tipo. Se establece que los fosfolípidos cargados negativamente, especialmente la PS, desempeñan un papel importante en el control del complejo de activación del factor X del complejo (X_{asa}) (Gilbert y otros (1996) J. Biol. Chem. 271 11120). En el Ejemplo 2, se presentan los resultados preliminares que sugieren que la SPS será capaz de jugar el mismo papel en la promoción de la formación de una X_{asa} humana. Finalmente, en el Ejemplo 3, se muestra que la SPS juega el mismo papel que las membranas que contienen PS en la regulación descendente de la generación de trombina por la APC.

Ejemplo 1

Ensamblaje y regulación de C6PS del complejo de generación de la protrombina

25 Materiales y métodos

Materiales. La Ecarina del veneno de serpiente *Echis carinatus*, la heparina, y EGTA se adquirieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). La dansilarginina-N-(3-etil-1, 5-pentanodilo) amida (DAPA) se obtuvo de Hematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT). El sustrato específico de la trombina, S-2238, y el sustrato del factor X_a, S-2765, se adquirieron de Kabi Diagnostica AB (Möndal, Suecia). El 1,2-dicaproil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (C6PS) se adquirió de Avanti® Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL), y las soluciones patrones se prepararon a partir de la solución madre de cloroformo comprado por medio del uso de métodos bien conocidos (Banerjee, y otros (2002) Biochemistry 41 (3): 950-7). La protrombina humana y el factor X_a y Pre2 y F1.2 se obtuvieron de Hematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT), y MzII_a se preparó como se describió (Pei y Lentz (1991) Blood Coagul. Fibrinolysis 2 (2): 309-16). El DEGR-X_a se preparó como se describió (Majumder, y otros (2002) *supra*). El factor V humano purificado se preparó a partir de plasma humano fresco congelado (Centro de la Cruz Roja Americana, Durham, NC) y luego al factor V_a se activa de acuerdo con los métodos estándar (Kane y Majerus (1981) J. Biol. Chem.256 (2), 1002 -7; Cutsforth, y otros (1996) Biophys J. 70 (6): 2938-49). La actividad de FV_a se probó por medio del uso de vesículas PS/PC 25/75 de acuerdo con métodos bien establecidos (Krishnaswamy, y otros (1989) J. Biol. Chem.264 (6): 3160-8)).

40 *Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).* Los controles para comprobar la aparición de las micelas de C6PS se llevaron a cabo mediante la medición de los diámetros de los agregados por medio del uso de la dispersión cuasi-elástica de la luz (Koppaka, y otros (1996) Biochemistry 35 (23): 7482-91). Este método es capaz de detectar tanto las micelas mínimas formadas por C6PS puro, así como los agregados más grandes formados en presencia de la protrombina, FX_a, FV_a, o una combinación de estas proteínas (Koppaka, y otros (1997) Biophys. J. 73 (5): 2638-52; Zhai, y otros (2002) *supra*; Majumder, y otros (2002) *supra*). La CMC determinada por este método coincide con los valores determinados por cambios en la actividad del factor X_a (Koppaka, y otros (1997) *supra*), en la fluorescencia de las sondas de fluorescencia de búsqueda de superficie (Koppaka, y otros (1997) *supra*) y, en el espectro CD del factor X_a (Majumder, y otros (2003) *supra*).

50 *Preparación de las vesículas de fosfolípidos.* Se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUV) extrudidas compuestas de 25/75 PS bovino y DOPC, y la concentración de fosfolípidos se determinó mediante los métodos descritos previamente (Wu, y otros (2002) *supra*).

55 *Mediciones de flujo detenido de la fluorescencia.* Las velocidades de formación de trombina a partir ya sea de MzII_a o Pre2 (con fragmento 1.2 equimolar), o de formación de trombina más MzII_a a partir de la protrombina humana, se estimaron a partir del cambio de fluorescencia dependiente del tiempo de DAPA unido a los productos de activación. El uso de DAPA para este fin está bien establecido (Nesheim, y otros (1979) Biochemistry 18 (6): 996-1003; Nesheim, y otros (1979) J. Biol. Chem.254 (21): 10952. -62; Krishnaswamy, y otros (1987) *supra*), y las velocidades de activación de

la protrombina medida en presencia de las membranas PS/PC por este método, se mostró que eran equivalente a las velocidades medidas con los sustratos específicos de la trombina o con la SDS-PAGE cuantitativa (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) J. Biol. Chem.278 (8): 5679-5684). Las mediciones de flujo detenido se realizaron por medio del uso de un reactor de flujo detenido SLM-Aminco Milliflow® (Spectronic Instruments, Inc., Rochester, NY) unido al espectrofluorómetro SLM 48000® (Spectronic Instruments) como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*). La jeringa A contenía la solución de sustrato y DAPA en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5, y la jeringa B contenía la protrombinasa pre-ensamblada (FX_a, FV_a y C6PS) en el mismo tampón, con las concentraciones finales de los factores X_a y V_{a2} en la cámara de reacción que eran de 1 y 5 nM y la relación sustrato/DAPA era 1/5. El cálculo de las velocidades a partir de las mediciones de la intensidad de fluorescencia inicial (F₀) y la intensidad al finalizar la reacción (F_∞) está bien establecida (Nesheim y Mann (1983) *supra*; Wu, y otros (2002) *supra*).

Mediciones de apagamiento químico rápido. Se realizaron experimentos de apagamiento rápido, por medio del uso del Chemical-Quench-Flow modelo RQF-3 de Kintek Corporation (State College, PA), a 37°C como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*). La solución de protrombina en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Ca²⁺ 5 mM, PEG 0,6% (para limitar la adsorción de trombina a las microplacas), pH 7,5, se cargó en el lazo de muestra, y el complejo de protrombinasa pre-ensamblada (las mismas concentraciones del factor que en los estudios de flujo detenido de fluorescencia) en el mismo tampón se cargó en otro lazo de muestra. La solución de apagamiento rápido fue 100 µl de solución de Na₂EGTA 100 mM, pH 7,5. Las alícuotas de las muestras recogidas se probaron para la actividad amidolítica por medio del uso de S-2238 en un lector de microplacas (SLT 340ATTC, SLT Instruments, Hillsborough, NC), y la concentración del sitio activo (I_a más MzII_a) se determinó mediante la comparación de la velocidad inicial de hidrólisis de S- 2238 con una curva patrón obtenida con la trombina con el sitio activo titulado como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*). La formación de MzII_a y trombina se distingue por la incubación de la alícuota de la mezcla de reacción durante 1 minuto a temperatura ambiente en presencia de heparina (10 µg/ml) y la antitrombina III (300 nM) para bloquear selectivamente la trombina pero no al sitio activo de MzII_a (Rosing, y otros (1986) J. Biol. Chem.261 (9):4224-8). La velocidad inicial de formación de trombina se obtuvo mediante la resta de la velocidad de aparición de MzII_a de la velocidad inicial de formación total del sitio activo.

Titulación de fluorescencia de DEGR-X_a por el FV_{a2} en presencia de C6PS. Estas mediciones se llevaron a cabo con un espectrofluorómetro SLM 48000® (SLM Aminco, Urbana, IL) como se describió (Majumder, y otros (2002) *supra*). La cubeta se cargó inicialmente con una solución de DEGR-X_a 1 nM y FV_a 5 nM con el fin de "condicionar" la cubeta (Boskovic, y otros (2001) *supra*). La cubeta contenía 0,95 ml de DEGR-X_a 1 nM y C6PS 400 µM en Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, Ca²⁺ 5 mM a pH 7,5. El FV_{a2} se añadió a partir de una solución madre, la mezcla se incubó durante al menos 2 minutos, y se tomaron varias lecturas de intensidad, se promedió, y se corrigió para la dilución.

Análisis por SDS-PAGE de la activación de la protrombina Las mezclas de reacción se describieron en los experimentos de apagamiento químico. Se tomaron alícuotas de 40 µl a 0,5, 0,75, 1, 1,25 y 1,5 segundos y se sometieron a electroforesis en gel (1,5 mm de poliacrilamida 12%) con y sin reducción con 2-mercaptoetanol 5% (v/v) (Laemmli (1970) *Naturaleza* 227 (259): 680-5). Las bandas de proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie coloidal (Mitra, y otros (1994) *Anal Biochem* 223 (2): 327-9) y las bandas de proteínas se cuantificaron como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*).

Electroforesis en gel nativo. Este método se ha usado para documentar la asociación de las proteínas de la coagulación de la sangre en solución (Majumder, y otros (2002) *supra*; Majumder, y otros (2003) *supra*). Una mezcla de FX_a 1 nM y FV_a 1 nM se incubó a 37°C durante 2 minutos en presencia y ausencia de C6PS 400 µM y las dos muestras se corrieron junto con proteínas marcadoras conocidas (270 kilodalton – 14.2 kilodalton; SIGMA, St. Louis, MO) en cinco geles (5, 6, 6,5, 7, y 8% de acrilamida total con bisacrilamida/acrilamida que era 1/29 en todos los casos) en un aparato minigel BioRad® Mini-Protean® II (Biorad® Corp., Hercules, CA) y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (Mitra, y otros (1994) *supra*). El FX_a y FV_a, en estas mismas concentraciones y en presencia de C6PS 400 µM, se corrieron por separado como controles. Los coeficientes de retardo de las proteínas, los cuales dependen en buena aproximación, sólo del tamaño hidrodinámico y la forma de la proteína, se determinaron tanto para el marcador y las proteínas desconocidas (Ferguson (1964) *Metabolism* 13:985-1002). Un gráfico log-log del coeficiente de retardo contra los pesos moleculares de las proteínas marcadoras produjo una curva lineal a partir de la cual se determinó el peso molecular del complejo FV_a•FX_a a partir de su coeficiente de retardo medido (Bryan (1977) *Anal. Biochem*78 (2): 513-9).

Análisis de la unión de FV_{a2}-FX_a La concentración total del complejo DEGR-X_a•V_a a cualquier concentración dada de C6PS ([DEGR-X_a•V_a]_(C6PS)) viene dada por la expresión conocida para la unión de dos especies:

$$\frac{[\text{DEGRX}_a \cdot \text{V}_a]_{\text{C6PS}}}{2} = \frac{[\text{DEGRX}_a]_{\text{tot}} + [\text{V}_a]_{\text{tot}} + K_d^{\text{eff}} - \sqrt{([\text{DEGRX}_a]_{\text{tot}} + [\text{V}_a]_{\text{tot}} + K_d^{\text{eff}})^2 - 4[\text{DEGRX}_a]_{\text{tot}}[\text{V}_a]_{\text{tot}}}}{2} \quad (1)$$

5 , donde los términos de concentración son todas concentraciones "totales" de cada especie en una muestra. El cambio en la señal de fluorescencia de DEGR-X_a se tomó como proporcional a la fracción de DEGR-X_a unido a FV_a:

$$\frac{F - F_0}{F_{\text{SAT}} - F_0} = \frac{[\text{DEGR} - \text{X}_a \cdot \text{V}_a]_{\text{C6PS}}}{[\text{DEGR} - \text{X}_a]_{\text{tot}}} \quad (2)$$

10 , donde el parámetro de fluorescencia F₀ se fijó como la fluorescencia de DEGR-X_a antes de comenzar la titulación y F_{SAT} es la fluorescencia en la saturación, la cual se obtuvo junto con la K_d^{eff} por regresión no lineal de los datos como se describe en (Majumder, y otros (2002) *supra*).

15 *Análisis cinético.* Para determinar las constantes cinéticas para los dos primeros eventos proteolíticos (las reacciones A y C, ver la **Figura 2**), tres cursos temporales determinados experimentalmente (la formación de trombina, la aparición de MzII_a, la aparición de Pre2) se ajustaron de acuerdo con un esquema de cinética de estado estacionario que asumió un mecanismo de reacción secuencial, paralelo (**Figura 4**), como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*). Una fracción, f, del consumo de protrombina se consideró que se convierte directamente a trombina sin el escape de un intermediario a partir del complejo membrana-enzima-cofactor (denominado canalización) (Boskovic, y otros (2001) *supra*; Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*). Los tres conjuntos de datos se ajustaron simultáneamente mediante el ajuste de las constantes de velocidad de primer orden R_a (para la reacción A, **Figura 2**), R_c (reacción C) y R_e (reacción E), mientras que R_b y R_d (para las reacciones B y D) se fijaron en los valores determinados de forma independiente en la presente. La competencia de los sustratos protrombina y MzII_a por los sitios activos de las enzimas se tomó en cuenta explícitamente durante el ajuste global de los datos por medio del uso del programa de simulación SCOP (Simulations Resources Inc., Berrin Springs, MI), como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*).

Ensamblaje del complejo

25 Las velocidades iniciales de activación de la protrombina por el FX_a tal como se controló por la fluorescencia de DAPA se muestran en la **Figura 2** como una función de FV_{a2} (**Panel A**) y FV_{a1} (**Panel B**) añadidos en presencia de C6PS 400 μM. La velocidad saturó para FV_{a2} (**Panel A**), pero no saturó para FV_{a1} (**Panel B**). La K_d aparente de interacción del FV_{a2} (2 nM) con el FX_a fue al menos 300 veces más fuerte que para FV_{a1} (> 1 μM). Este resultado demuestra que estas dos formas del FV_a humano tienen capacidades muy diferentes de interactuar con el FX_a en presencia de C6PS, y que también tienen actividades de cofactor diferentes cuando se unen al FX_a en presencia de C6PS soluble. La fuerte unión de FV_{a2} con FX_a en presencia de C6PS condujo al uso del FV_{a2} como cofactor en todos los experimentos cinéticos descritos en la presente. El recuadro de la **Figura 2 (Panel A)** muestra el tamaño de los agregados detectados a concentraciones de C6PS diferentes bajo las condiciones usadas para los experimentos de cinética (1 nM FX_a y 5 nM FV_{a2}). A partir de esto, se determinó que la concentración micelar crítica (CMC) de C6PS en presencia de los factores X_a y V_{a2} era de aproximadamente 700 μM. No se detectaron agregados por debajo de esta concentración.

35 La fuerte unión del FV_{a2} humano al FX_a humano de sitio activo marcado (DEGR-X_a) en presencia de C6PS 400 μM también se ilustra en el recuadro izquierdo de la **Figura 3**, el cual muestra la intensidad de fluorescencia de DEGR-X_a como una función de la concentración del FV_{a2} añadido. La **Figura 3** también muestra un gráfico de Ferguson (Ferguson (1964) *supra*) de los coeficientes de retardo de las proteínas patrones y de FX_a y FV_{a2} en ausencia (carril 1) y presencia (carril 2) de C6PS. La aparición de una única y bien definida banda en el carril 2 (**Figura 3**; estrella de 5 puntas en el gráfico de Ferguson) confirmó que el FV_{a2} y el FX_a formaron un complejo bien definido en presencia de C6PS 400 μM (masa molecular de 224 ± 3,7 kilodalton como se determinó por el método de análisis de Ferguson). En ausencia de C6PS, no apareció el complejo (carril 1, recuadro de la derecha de la **Figura 3**), y los pesos moleculares medidos fueron 45,9 ± 1,2 y 176,45 ± 2 kilodalton para el FX_a (triángulo) y el FV_{a2} (estrella de 4 puntas), respectivamente, en comparación con los valores reportados de 46 kilodalton para el FX_a (Leytus, y otros (1986) *Biochemistry* 25 (18): 5098-102) y 177 kilodaltons para el FV_{a2} (Kane y Majerus (1981) *supra*). Las masas moleculares de los factores V_{a2} y X_a también se midieron en presencia de C6PS 400 μM (para saturar FV_{a2} y saturar el sitio regulador en FX_a) para obtener 178,5 ± 1,4 y 46,6 ± 1 kilodalton, respectivamente. Estas masas moleculares son coherentes con estas proteínas que se unen a 4,2 y 1,5 moléculas de C6PS, respectivamente, basado en el supuesto de que el volumen molar de C6PS es el de la proteína (0,76 cm³/g). Las estequiometrías de unión de C6PS a estas proteínas en la saturación, basado en los métodos directos de diálisis en equilibrio, son 4 y 2, respectivamente (Zhai, y otros (2002) *supra*; Banerjee, y otros (2002) *supra*). Estos resultados confirman tanto la capacidad del análisis Ferguson de informar los pesos moleculares precisos para las proteínas del complejo de protrombinasa, así como la capacidad del método de Ferguson para proporcionar estimaciones razonables del número de moléculas de C6PS unidas a estas

proteínas, incluso cuando los geles se corrieron en presencia de C6PS y se hizo referencia a proteínas no unidas al patrón de C6PS.

Complejo soluble contra agregado de lípidos

5 Es razonable preguntar si el complejo involucra la unión del FV_{a2} a FX_a a un agregado o micela de C6PS. En primer lugar, se detectaron las micelas de C6PS por dispersión cuasi-elástica de la luz y fluorescencia ANS (Koppaka, y otros (1996) *supra*) bajo las condiciones de este experimento sólo a C6PS 700 μ M y por encima de la cual está muy por encima de la concentración que se usó en los experimentos en la presente. La dispersión cuasi-elástica de la luz detectó la mínima micela que se podría predecir para C6PS (-200 monómeros) (Koppaka, y otros (1996) *supra*). Las micelas de C6PS formadas en presencia del complejo X_a - V_{a2} contenían \sim 17,000 a 125,000 monómeros (en dependencia de la concentración de C6PS, ver el recuadro en la **Figura 2**) y por lo tanto fueron mucho más fáciles de detectar. Por lo tanto, la dispersión cuasi-elástica de luz fue ciertamente suficiente para detectar micelas de C6PS si se formaban bajo las condiciones de los experimentos realizados en la presente. Dado que las micelas son agregados, su formación se asemeja a una transición de fase, es decir, las sustancias anfipáticas existen como monómeros en solución hasta una concentración micelar crítica bien definida (CMC) y luego como micelas en equilibrio con monómeros por encima de esa concentración (Tanford (1973) *The hydrophobic effect*, John Wiley & Sons, Nueva York). Por lo tanto, al trabajar por debajo de la CMC, se minimizó la posibilidad de que incluso una pequeña concentración de micelas contribuyera a la cinética de activación de la protrombina.

20 Se examinó la posibilidad de que el complejo $FX_a \cdot FV_{a2}$ se pudiera formar sobre alguna "micro-superficie" hipotética que se pudiera nuclear sobre el complejo de proteínas. El complejo activo $FX_a \cdot FV_{a2} \cdot C6PS$ observado en los experimentos cinéticos que se describen a continuación tiene una masa molecular de $224 \pm 3,7$ kDalton (ver **Figura 3**). Esta masa molecular fue consistente con una estequiometría de 1:1:3,4 \pm 7,7 (X_a : V_{a2} : C6PS). El error en esta medición (*es decir*, \pm 7,7 C6PS) fue tal que el número exacto de moléculas de C6PS unidas al complejo no se pudo determinar, pero, dentro de esta barra de error, era probable que no más de 11 y no menos de 0 moléculas de C6PS se unieran al complejo. En base a la estequiometría para la unión de C6PS a FX_a (2) y FV_{a2} (4), tal como se determinó mediante la diálisis en equilibrio (Srivastava, y otros (2002) *supra*; Zhai, y otros (2002) *supra*), este número más probable era 5 a 6 moléculas de C6PS. Era poco probable que sólo 5-6 (a lo sumo 11) moléculas de C6PS pudieran formar una superficie con sus grupos de la cabeza accesibles al agua (y X_a y V_{a2}) y sus cadenas enterradas fuera del agua, cuando tal disposición sería termodinámicamente inestable. Incluso si dicho agregado pequeño fuera posible, un agregado de este tamaño no es suficiente para ensamblar una protrombinasa similar a una membrana, ya que se necesitan como mínimo aproximadamente 25 lípidos para acomodar cada una de estas proteínas a la superficie de la membrana (Cutsforth, y otros (1989) *Biochemistry* 28 (18): 7453-61; Cutsforth, y otros (1996) *supra*). Adicionalmente, las 5-6 moléculas de C6PS están unidas a regiones muy diferentes del factor X_a (una en el par de EGF y una en el dominio catalítico (Srivastava, y otros (2002) *supra*)) y el factor V_a (dos en la cadena pesada, dos en la cadena ligera con uno de éstos en el dominio C2 (Srivastava, y otros (2001) *Biochemistry* 40 (28): 8246-55; Zhai, y otros (2002) *supra*). Por lo tanto, es poco probable que estos pocos lípidos pudieran agruparse en cualquier tipo de superficie; incluso en una micro-superficie hipotética. Los resultados proporcionados en la presente demostraron que en solución se formaron complejos de $FV_{a2} \cdot FX_a$ en respuesta a la unión de las moléculas de C6PS individuales a FX_a y FV_{a2} en lugar del ensamblaje de este complejo sobre agregados de C6PS.

40 Cinética de activación de la protrombina

Para comparar las actividades de C6PS y protrombinasa ensamblada en membranas, se determinaron las constantes de velocidad de segundo orden para las cinco posibles etapas de reacción de activación de la protrombina (**Figura 4**). Dos de estas crearon los intermediarios $MzII_a$ y $Pre2 + F1.2$ (reacciones C y D en la **Figura 4**), y dos de estas (reacciones B y D) convirtieron los intermediarios a trombina. Una quinta vía (E en la **Figura 4**) convirtió la protrombina en trombina sin liberación de un compuesto intermediario (canalización o activación procesiva) (Boskovic, y otros (2001) *supra*; Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*). La activación de $MzII_a$ y $Pre2 + F1.2$ a trombina refleja la escisión de enlaces peptídicos individuales (ver la leyenda de la Figura 4). Los cursos temporales de formación de trombina a partir de $MzII_a$ o $Pre2 \& F1.2$ se determinaron mediante experimentos de flujo detenido como se describió. El análisis de los trazados de las velocidades iniciales de formación de trombina (proporcional al cambio de fluorescencia de DAPA) medidos a diferentes concentraciones lipídicas como una función de concentraciones crecientes de $MzII_a$ (**Figura 5, Panel A**) y $Pre2 \& F1.2$ (**Figura 5, Panel B**) en términos del modelo de Michaelis-Menten se llevó a cabo para obtener la K_M (cuadrados) y la $V_{m\acute{a}x}$ (triángulos) que definen la cinética de activación de $MzII_a$ y $Pre2 \& F1.2$ en diferentes concentraciones de C6PS (recuadros en la **Figura 5, Paneles A y B**, respectivamente). Para comparar la protrombinasa ensamblada en C6PS con el comportamiento cinético conocido de la protrombinasa ensamblada en membranas, se necesitaron constantes de velocidad de segundo orden (k_{cat}/K_M). Para calcular estas a partir de $V_{m\acute{a}x}/K_M$, se requirió una estimación de la fracción del total de FX_a incorporado en la protrombinasa. Para obtener esto, el K_d^{eff} para la interacción $FX_a \cdot FV_a$ (**Figura 3**) se usó para calcular, por medio del uso de la Ecuación 1, la concentración eficaz de la enzima protrombinasa ensamblada, E_{unida} , como se describió (Majumder, y otros (2002) *supra*). La eficacia de la k_{cat} se calculó como $V_{m\acute{a}x}/E_{unida}$, que conduce a los valores de k_{cat}/K_M resumidos en la **Figura 4**.

La DAPA es un inhibidor débil competitivo de FX_a (Nesheim, y otros (1979) *supra*). A pesar de esto, se ha demostrado que proporciona velocidades de activación de la protrombina en presencia de membranas de PS/PC equivalentes a las detectadas por mediciones de actividad (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*). Para probar si DAPA influyó en la actividad de FX_a en presencia de C6PS, la fluorescencia de DAPA esperada, se calculó en base a la velocidad de aparición de la trombina y $MzII_a$, tal como se detectó mediante el ensayo del sustrato sintético como se registró en la **Figura 6A**. Este cálculo se describió (Wu, y otros (2002) *supra*) y sus resultados, tal como se aplicaron a los datos en la presente, se muestran en el recuadro de la **Figura 6A** (círculos negros) junto con un curso temporal experimental del cambio de fluorescencia de DAPA (rombos en blanco) reflejaron la activación de protrombina. Se obtuvieron resultados similares en las otras concentraciones de protrombina examinadas. Estos resultados demostraron que DAPA reflejaba la actividad de FX_a exactamente como la reflejaban otros métodos en ausencia de DAPA. Así, la concentración de DAPA que se usó en la presente no influyó en la actividad de FX_a en un grado medible.

Para completar el análisis de la cinética de la protrombinasa ensamblada en C6PS, se necesitaban las constantes de velocidad para los pasos iniciales que se muestran en la **Figura 4** (las reacciones A y C), así como para la vía de canalización (la reacción E). Las velocidades de estas reacciones son difíciles de medir directamente, por lo tanto, se usó un enfoque descrito anteriormente para la protrombinasa ensamblada en la membrana (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*). La **Figura 6A** muestra los cursos temporales iniciales de aparición de la trombina (círculos) y de $MzII_a$ (cuadrados) medidos por el ensayo del sustrato sintético (símbolos en negro), así como estos cursos temporales y los de la aparición de Pre2 (triángulos), medidos por SDS-PAGE (símbolos en blanco). Como la velocidad de formación de la trombina fue mucho mayor que la velocidad de aparición de $MzII_a$ a C6PS 400 μM , o la importante formación de trombina se produjo a través de la vía de Pre2 o una gran fracción de $MzII_a$ y/o Pre2 se procesó rápidamente directamente a trombina, y por lo tanto no se detectó como intermediario liberado. Debido a que no se detectó la formación de Pre2, la primera posibilidad no se pudo excluir, y debe ser que una fracción del compuesto intermediario (s) se procesa directamente a trombina (la reacción E en la **Figura 4**) tal como se produce para la protrombinasa ensamblada en la membrana (Weinreb, y otros (2003) *supra*). Para determinar estimaciones cuantitativas de constantes de velocidad para las reacciones C y E, los datos en la **Figura 6A** se ajustaron, como se describió (Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*), con constantes de velocidad para las reacciones B y D ajustadas en los valores que se muestran en la **Figura 4**. Las constantes de velocidad resultantes de la reacción A, C, y E también se resumen en la **Figura 4**. La comparación de estas constantes de velocidad con constantes de velocidad conocidas (Banerjee, y otros (2002) *supra*; Wu, y otros (2002) *supra*; Weinreb, y otros (2003) *supra*) establece que los complejos de ensamblados de C6PS y de membranas son similares en dos aspectos: ambos causan fracciones significativas (58% para C6PS y 50-60% para las membranas) de protrombina para convertirse directamente ("canalizado") en trombina, y que ambas dirigen la activación casi exclusivamente a través del intermediario $MzII_a$. Debido a que la velocidad de conversión de $MzII_a$ a trombina es aproximadamente la misma que la velocidad de la reacción E, casi toda la trombina que se forma inicialmente por el complejo de C6PS ensamblado se forma por la vía de la reacción E (canalización; **Figura 6B**), al igual que para el complejo de la membrana (Weinreb, y otros (2003) *supra*).

A pesar de estas similitudes, hay una diferencia inesperada entre los complejos de C6PS y de membrana en que la activación es aproximadamente un orden de magnitud más rápida para el complejo de C6PS ensamblado. Esto puede ser debido a que el complejo de C6PS ensamblado en realidad es más activo o porque FV_{a2} es un cofactor algo mejor en solución que lo que es la mezcla de FV_{a1} & FV_{a2} natural sobre una membrana. Para distinguir entre estas posibilidades, las velocidades iniciales de formación de trombina más $MzII_a$ a partir de la protrombina se determinaron en presencia de membranas de C6PS solubles y PS/PC 25% bajo condiciones experimentales idénticas, pero con el total de FV_a o FV_{a2} como cofactores. La totalidad de k_{cat}/K_M estimada a partir de estas mediciones para la activación de la protrombina por FX_a y FV_{a2} en presencia de C6PS ($2,2 \times 10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1}$) fue dos veces menor que en presencia de las membranas ($4,4 \times 10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1}$). La activación general por el complejo de membrana que contenía FV_{a2} fue de aproximadamente 40-veces más rápido que para el que contenía FV_a ($k_{cat}/K_M \sim 10^7 M^{-1} \text{seg}^{-1}$), lo que confirmó que FV_{a2} era un cofactor algo mejor que la mezcla natural, incluso en una membrana. Para realizar otra comparación de las actividades de los cofactores FV_{a2} y FV_a , se compararon las velocidades de activación de $MzII_a$ por el FX_a en membranas de PS/PC en presencia de FV_{a2} ($3,0 \times 10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1}$) o FV_a ($2,9 \times 10^7 M^{-1} \text{seg}^{-1}$), lo que confirmó que el FV_{a2} es el mejor cofactor en una membrana, incluso cuando solamente se corte un enlace. La velocidad de esta reacción para el complejo FX_a - FV_{a2} de C6PS ensamblado ($3,5 \times 10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1}$) es casi idéntica a la velocidad observada con el mismo cofactor en membranas. Dado que esta solución y los complejos de membrana son casi idénticos con respecto a esta reacción de una sola etapa y porque la extensión de la canalización es casi idéntica para los complejos de membrana y C6PS ensamblados, el menor aumento de dos veces la velocidad de activación general para el complejo de membrana probablemente refleje la entrega ligeramente mejorada del complejo de protrombina unida a la membrana sobre la superficie de la membrana. Este efecto posible de una superficie de membrana se ha discutido (Rosing, y otros (1980) *supra*; Nesheim, y otros (1984) *J. Biol. Chem.* 259 (3): 1447-53; Giesen, y otros (1991) *supra*), pero la magnitud del efecto se ha supuesto generalmente que es mucho mayor que el que se informa en la presente.

Ejemplo 2**Complejo de activación del factor X****Resultados**

La **Figura 8** muestra que la fluorescencia intrínseca del triptófano del factor IX_a cambió con la adición de C6PS soluble en presencia de calcio 5 mM, lo que sugirió que la C6PS se unió al factor IX_a. La curva se ajustó mediante un modelo de sitio de unión único (Ecuaciones 1 & 2 en el Ejemplo 1) para obtener una K_d estequiométrica de aproximadamente 1,3 μM. Con el fin de asegurarse de que una forma molecular de C6PS, y no las micelas, eran la causa de este efecto, se determinó la CMC de C6PS (por medio del uso de ANS como una sonda fluorescente) bajo las mismas condiciones experimentales (Koppaka y otros 1997 *supra*), y se encontró que era 950 μM, lo cual es mucho mayor que la concentración más alta de C6PS que se usó en este experimento (ver el recuadro en la **Figura 8**). La **Figura 9** muestra la actividad amidolítica (sustrato Leu-PHG-Arg-pNA-AcOH, que no depende de glicol de etileno) del factor IX_a 300 nM en presencia de una concentración creciente de C6PS. Un ajuste de estos datos a un modelo de unión de un solo sitio dio una K_d de 130 μM. La diferencia de 2 órdenes de magnitud en los dos valores de K_d mostraron que IX_a, de la misma manera que el factor X_a (Banerjee (2002) *Biochemistry* 41 7751), tenía dos sitios de unión para C6PS. Estos resultados también establecieron que el factor IX_a, también de la misma manera que el factor X_a (Koppaka y otros 1997 *supra*; Majumder y otros (2002) *Biophysical Journal* 84 1238), sufría cambios en su sitio activo al unirse a C6PS.

La C6PS promueve la activación proteolítica del factor X por el factor IX_a, al igual que promueve la activación proteolítica de la protrombina por el factor X_a. La **Figura 10** muestra la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a en presencia de concentraciones crecientes de la fosfatidilserina soluble. Los valores de K_d similares de las **Figuras 9 y 10** muestran que un sitio de C6PS común en el factor IX_a reguló las actividades amidolíticas y proteolítica. La velocidad de activación del factor X por el factor IX_a en presencia de C6PS 700 μM se controló a diferentes concentraciones del factor X (**Figura 11**). La K_M para esta reacción fue 300 nM, la cual es la misma que la obtenida con membranas de PS/PC 20% (Larson y otros (1996) *J. Biol. Chem.* 271 3869). La **Figura 11** (recuadro) muestra que la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a en C6PS 700 μM era idéntica a la velocidad determinada en presencia de las membranas de PS/PC 20%. Estos resultados demuestran que la C6PS puede sustituir totalmente las membranas que contienen PS en la activación del factor X por el factor IX_a.

La **Figura 12** muestra la velocidad de activación del factor X por el factor IX_a frente a la concentración de C6PS a diferentes concentraciones de calcio. Tanto como aumenta la concentración de Ca²⁺, aumenta también la activación proteolítica del factor X por el factor IX_a. La mejoría de la activación del factor X parece saturar a una concentración de calcio de 3 mM. Los datos en la **Figura 12** demuestran que tanto la C6PS y el calcio mejoran la activación proteolítica del factor X por el factor IX_a.

Ensamblaje de un complejo FVIII_a-FIX_a activo

Una cuestión es si la SPS puede promover el ensamblaje de un complejo VIII_a-IX_a completamente activo en solución.

La velocidad de activación del factor X por el factor IX_a 2,5 nM y el factor VIII_a 10 nM en presencia de C6PS 600 μM se controló a diferentes concentraciones del factor X (**Figura 13**). La K_M para esta reacción fue de 66 nM, la cual fue similar a la obtenida con las membranas de PS/PC 30% (45 nM) (Larson y otros (1996) *J. Biol. Chem.* 271 3869). Estos resultados mostraron que la K_M para la activación del factor X por el factor IX_a en presencia de C6PS se redujo 5 veces con la adición de VIII_a.

El ensamblaje de un complejo VIII_a-IX_a activo en presencia de C6PS también se pudo demostrar por medio del estudio directo de la unión del factor IX_a con el factor VIII_a en presencia de C6PS, por ejemplo, por medio del uso del factor IX_a marcado con la dansil-glutamil-glicil-arginil-clorometilcetona (DEGR-IX_a).

Ejemplo 3**Regulación de la SPS sobre la inactivación del factor V_a por APC**

La APC corta tres enlaces en la cadena pesada del factor V_a, uno en la Arg⁵⁰⁶ más rápidamente, uno en la Arg³⁰⁶ menos rápidamente, y uno en la Arg⁶⁷⁹ que probablemente no afecta la pérdida de la actividad del cofactor. La proteólisis en la Arg⁵⁰⁶ conduce a la inactivación parcial, pero para la inactivación completa es necesaria la proteólisis en la Arg³⁰⁶ (Kalafatis & Mann (1993) *J. Biol. Chemistry* 268 27246; Nicolaes y otros (1995) *J. Biol. Chemistry* (1995) 270 21 158). Las membranas que contienen fosfolípidos cargados negativamente (especialmente la PS) promueven la proteólisis de los tres enlaces, pero el efecto más grande de las membranas es sobre la proteólisis en la Arg³⁰⁶, una reacción que es muy lenta en ausencia de membranas ($k_{cat}/K_M = 10^2$ a 10^3 M⁻¹seg⁻¹, pero aumenta a una velocidad de $k_{cat}/K_M = 2-7 \times 10^6$ M⁻¹seg⁻¹ en presencia de las membranas que contienen PS (Nicolaes y otros *J. Biol. Chemistry* (1995) 270 21 158; Hoekema y otros (1997) *Biochemistry* 36 3331; Egan y otros (1997) *Protein Science* 6 2016). Se encontró que la SPS puede sustituir completamente las membranas que contienen PS en el efecto que tiene sobre la proteólisis en la Arg³⁰⁶ (**Figura 14**). La velocidad de proteólisis del enlace en la Arg³⁰⁶ aumentó desde indetectable hasta un valor $k_{cat}/K_M = 3-3,5 \times 10^6$ M⁻¹seg⁻¹, idéntica a la velocidad informada con las membranas que contienen PS. Otros experimentos

muestran que la SPS se une muy fuertemente ($k_d \sim 1 \mu\text{M}$) a la APC, pero los datos en la **Figura 14** muestran que suficiente C6PS para saturar este sitio ($4 \mu\text{M}$) no tuvo efecto sobre la velocidad de inactivación y sólo un pequeño efecto sobre el grado de inactivación. Sin embargo, C6PS $200 \mu\text{M}$, suficiente para saturar el factor V_a ($k_d \sim 90 \mu\text{M}$; Zhai y otros (2002) *Biochemistry* 41 5675), condujo a la inactivación completa mediante la promoción de la escisión en la Arg³⁰⁶. Estos resultados indicaron que la PS de unión al factor V_a condujo a la susceptibilidad de este enlace al ataque de la APC, y que el MSF puede sustituir a las membranas que contienen PS en el ensayo de APC.

Ejemplo 4

Ensayos de coagulación por medio del uso de C6PS

Las vesículas lipídicas convencionales se compararon con C6PS en dos ensayos diferentes de coagulación – la prueba de tiempo de la tromboplastina parcial activada (APTT) y un ensayo cromogénico de FVIII.

Ensayo de aPTT.

Los ensayos de tiempo de la tromboplastina parcial activada se realizaron por medio del uso un método de detección óptica para determinar el tiempo de coagulación. Se crearon dos mezclas de reacción. La mezcla A tenía caolín en concentraciones en el intervalo de 50 g/l a 500 g/l y, y las vesículas de fosfolípidos (en el intervalo de 0,67 hasta 240 μM) o C6PS (en el intervalo de 5 μM a 5250 μM) en tampón de HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM. La mezcla B era cloruro de calcio 25 mM en un tampón HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM. El plasma, la mezcla A y la mezcla B se incubaron todos a 37°C durante 3 minutos. La mezcla A se añadió al plasma y se incubó durante 3 minutos a 37°C. Se añadió el tampón B y se midió la densidad óptica. La coagulación se detectó como un aumento de la absorbancia.

Como era de esperar, las vesículas de lípidos acortaron el tiempo de coagulación inducida por el caolín de una manera dependiente de la dosis tanto como 100 segundos. La C6PS rindió un acortamiento en el tiempo de coagulación dependiente de la dosis, pero la mayor disminución fue de 13 segundos. Se especula que el caolín podría interferir con la C6PS. Puesto que el propósito del caolín era activar los factores de contacto de la coagulación (el quinínogeno de alto peso molecular, el factor XII, y el factor XI), se sustituyeron 30 nM del factor XI activado por el caolín en el ensayo descrito anteriormente. En este caso, las vesículas de lípidos fueron menos eficaces, con un acortamiento máximo de sólo 80 segundos, mientras que la C6PS fue más efectiva con un acortamiento máximo de 20 segundos. Esto sugirió que, al igual que con los ensayos con vesículas de lípidos, la composición del activador en el APTT se podía optimizar para la actividad con C6PS.

Ensayo cromogénico del FVIII.

Para el ensayo cromogénico del factor VIII, se preparó una curva estándar por dilución del plasma normal concentrado (el cual tenía 1 U/ml del factor VIII según las hojas de certificación) en el plasma deficiente de factor VIII para dar niveles de factor VIII de 100%, 75%, 50 %, 25%, y 10% junto con el plasma deficiente en factor VIII, el cual tiene 0% de factor VIII.

Se prepararon dos mezclas. La mezcla # 1 consistió de trombina - 3 nM, factor IXa - 3 nM, factor X – 7,2 $\mu\text{g/ml}$, calcio - 12 mM en un tampón de Tris 20 mM (pH 7,9), NaCl 150 mM. También se incluyeron en la mezcla # 1 las vesículas lipídicas (las vesículas lipídicas unilamelares, "LUV") - 20 μM o C6PS – 2 625 μM . La mezcla # 2 consistió de hirudina - 60 nM y Pefachrome FXa – 1,8 mM en un tampón Tris 20 mM (pH 7,9), NaCl 150 mM.

Los niveles del factor VIII se probaron mediante la adición de 25 μl de plasma a 2000 μl de tampón. 50 μl del plasma diluido, 100 μl de la mezcla # 1, y 100 μl de la mezcla # 2 se incubaron a 37°C durante 3 minutos. A continuación, 50 μl de la mezcla # 1 se añadió a plasma diluido y se incubó a 37°C durante 2 minutos. Finalmente, 50 μl de la mezcla # 2 se añadió al plasma diluido + la mezcla # 1 y la reacción se controló a 405 nm durante 5 minutos. La velocidad es el cambio en la absorbancia entre 30 segundos y 120 segundos expresada como mOD/minuto. Los resultados se muestran en la **Figura 15** (vesículas de lípidos) y la **Figura 16** (C6PS).

El efecto de variar los niveles de C6PS también se controló como se describió anteriormente por medio del uso del plasma normal concentrado (100% del factor VIII), excepto que la concentración de C6PS en la mezcla # 1 se varió mediante dilución en serie en el tampón antes de añadirse a la mezcla # 1 final. Los resultados se expresaron como la concentración de lípido o C6PS en la mezcla de reacción final de 150 μM (**Figura 17**) y demostraron que la velocidad de formación de coágulos se saturó con la concentración de C6PS, obteniéndose una concentración apropiada para el ensayo de coagulación. Estos resultados muestran que se pueden encontrar las condiciones en que los fosfolípidos solubles puedan reemplazar los lípidos insolubles en un ensayo de coagulación para el factor VIII.

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar un ensayo para la actividad de coagulación en una muestra que comprende sangre o plasma de un sujeto **caracterizado porque** el fosfolípido que es soluble en la muestra es sustituido por las membranas de plaquetas o las membranas sintéticas en el ensayo.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el ensayo es un ensayo de coagulación de vía intrínseca.
3. Un método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende:
 - (a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con:
 - (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
 - (ii) un activador de contacto; y
 - (iii) calcio;
 - (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación de la protrombina; y
 - (c) detectar la actividad del factor X_a o la trombina, en la que la actividad del factor X_a o la trombina es indicativa de la actividad del factor de coagulación en la muestra.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra no contiene agregados detectables como se determinó por la dispersión cuasi-eléctrica de la luz.
5. El método de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la muestra se combina adicionalmente con Proteína C activada o un activador de Proteína C, en donde el nivel de actividad de la trombina es indicativo de la resistencia Proteína C activada en la muestra.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la muestra se combina adicionalmente con plasma empobrecido en Proteína S, en donde el nivel de actividad de la trombina es indicativo de los niveles de la Proteína S en la muestra.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a la reivindicación 6, en donde la muestra se combina adicionalmente con un plasma seleccionado del grupo que consiste de:
 - (a) plasma conocido por ser deficiente para un factor de coagulación particular; y
 - (b) plasma normal.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a la reivindicación 7, en donde la actividad enzimática de la trombina se mide, que además comprende opcionalmente la etapa de comparar la actividad de la trombina detectada con un estándar, o en donde se detecta la formación del coágulo.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende:
 - (a) combinar una muestra que comprende sangre o plasma con:
 - (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
 - (ii) un activador de contacto; y
 - (iii) calcio;
 - (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación del coágulo.
10. El método de la reivindicación 9, que además comprende:
 - (c) determinar un tiempo de coagulación para la muestra; y opcionalmente
 - (d) comparar el tiempo de coagulación determinado para la muestra con un estándar.
11. Un método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende:
 - (a) combinar una muestra que comprende plasma con:
 - (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
 - (ii) el factor tisular soluble; y
 - (iii) calcio;

(b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación de la protrombina; y

(c) detectar la actividad de la trombina, en donde la actividad de la trombina es indicativa de la actividad del factor VIIa en la muestra.

5 **12.** Un método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende:

(a) combinar una muestra que comprende plasma con:

(i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;

(ii) el factor X exógeno;

10 (iii) los factores de la coagulación activados dependientes de fosfolípidos diferentes del factor X que son dependientes del factor de coagulación que se evalúa en la vía intrínseca de la coagulación o se requieren para la activación del factor de coagulación que se evalúa; y

(iv) calcio;

(b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación del factor X a factor X_a; y

15 (c) detectar la actividad del factor X_a, en donde la actividad del factor X_a es indicativa de la actividad del factor de coagulación en la muestra.

13. El método de la reivindicación 12, en donde se detecta la actividad del Factor X_a: (a) por un ensayo espectrofotométrico para el Factor X_a;

(b) mediante la detección de la actividad de la trombina en la muestra; o

20 (c) mediante la detección de la formación del coágulo.

14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el método se lleva a cabo para evaluar la actividad de FVIII_a, el método comprende:

(a) combinar una muestra que comprende plasma con:

(i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;

25 (ii) el factor X exógeno;

(iii) el factor Factor IX_a exógeno; y

(iv) calcio;

(b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación del factor X a factor X_a; y

30 (c) detectar la actividad del Factor X_a, en donde la actividad del Factor X_a es indicativa de la actividad del Factor VIII_a en la muestra.

15. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el método se lleva a cabo para evaluar la actividad del Factor IX_a, el método comprende:

(a) combinar una muestra que comprende plasma con:

35 (i) un fosfolípido que es soluble en la muestra;

(ii) el factor X exógeno;

(iii) el factor VIII_a exógeno o FVIII exógeno y un activador FVIII ; y

(iv) calcio;

40 (b) incubar la mezcla de (a) anterior, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la activación del factor X a factor X_a; y

(c) detectar la actividad del Factor X_a, en donde la actividad del Factor X_a es indicativa de la actividad del Factor IX_a en la muestra.

- 5
16. El método de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde la muestra se combina adicionalmente con trombina.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra consiste prácticamente de un fosfolípido seleccionado del grupo que consiste de fosfatidilserina, fosfatidilhomoserina, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, y una combinación de éstos.
- 10
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra comprende ácidos grasos acilados C2 a C14 o C16, o ácidos grasos acilados C4 a C10 o C12 o C6 fosfatidilserina.
19. El método de la reivindicación 17, en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra consiste de ácidos grasos acilados C4 a C10 o C12 o C6 fosfatidilserina.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra se añade a una concentración final de 4 μM a 2 mM.
21. El método de la reivindicación 20 en donde dicho fosfolípido se añade a una concentración final de al menos 50 μM y menos que 2 mM.
- 15
22. El método de la reivindicación 21 en donde dicho fosfolípido se añade a una concentración final de al menos 100 μM y menos que 2 mM.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sangre o plasma es sangre o plasma humano.
- 20
24. Uso de un fosfolípido que es soluble en una muestra que comprende sangre o plasma de un sujeto en un ensayo para la actividad de coagulación, en donde el fosfolípido que es soluble en la muestra es sustituido por las membranas de plaquetas o las membranas sintéticas en el ensayo del factor de coagulación.
25. El uso de la reivindicación 24, en donde el ensayo es de actividad de coagulación de vía intrínseca.
26. El método o uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra es de un sujeto con lupus.
- 25
27. Una composición de ensayo que comprende:
- (a) una muestra de plasma;
- (b) un fosfolípido que es soluble en la muestra;
- (c) un reactivo seleccionado del grupo que consiste de (i) un activador de contacto, (ii) un factor tisular soluble, y (iii) Factor X exógeno;
- 30
- (d) calcio; y, opcionalmente,
- (e) Factor IX_a exógeno;
- en donde la composición de ensayo no contiene membranas de plaquetas o membranas sintéticas añadidas exógenamente.

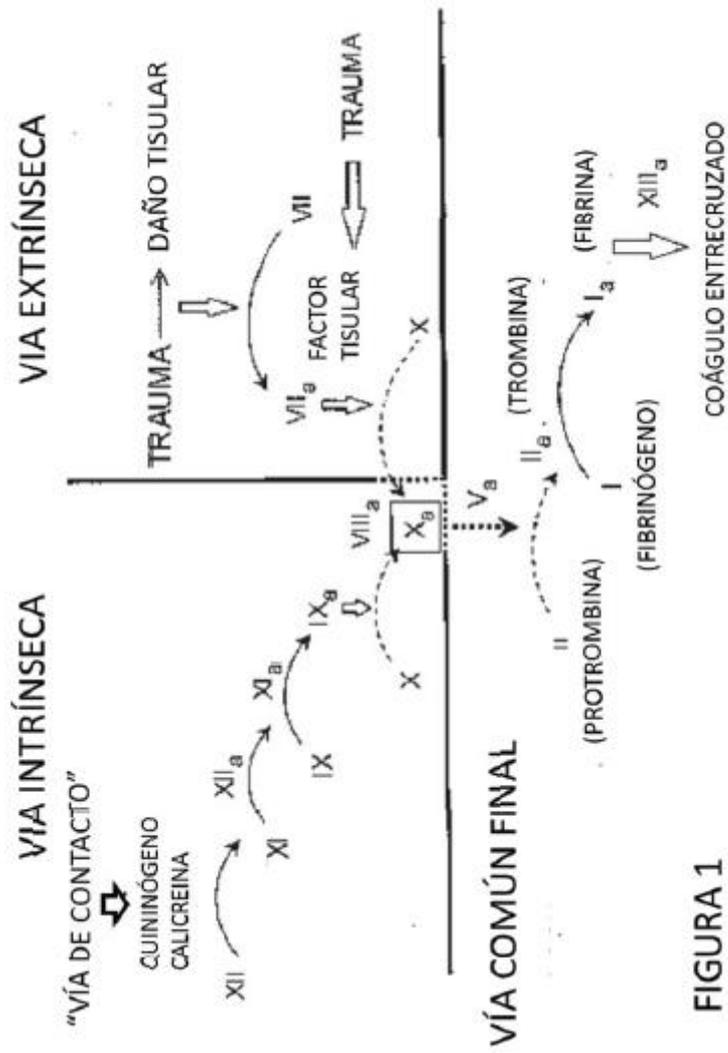
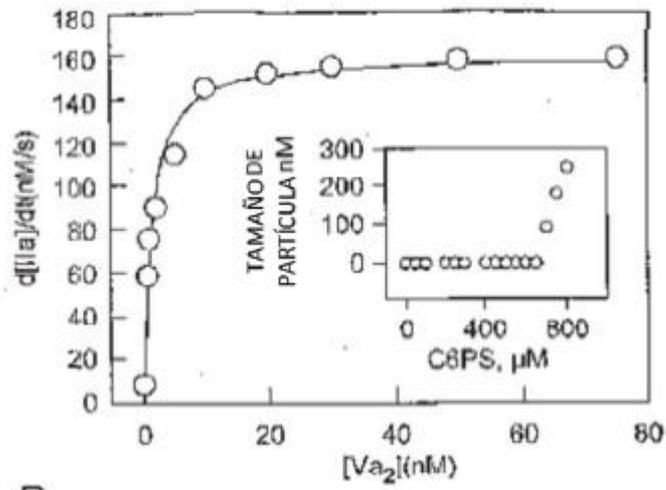


FIGURA 1

A.



B.

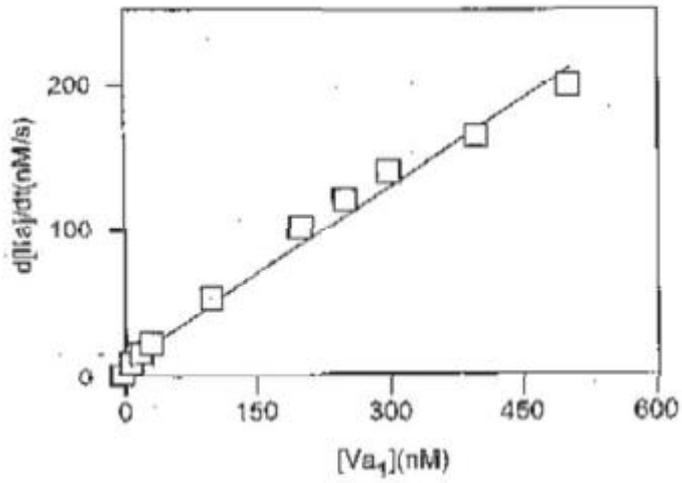


FIGURA 2

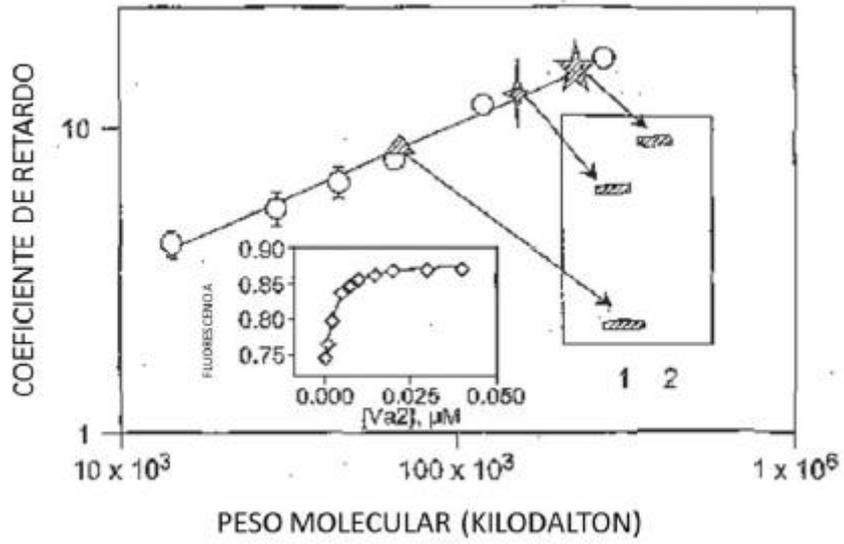


FIGURA 3

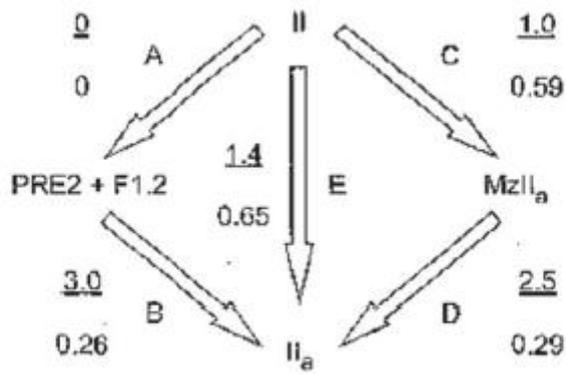


FIGURA 4

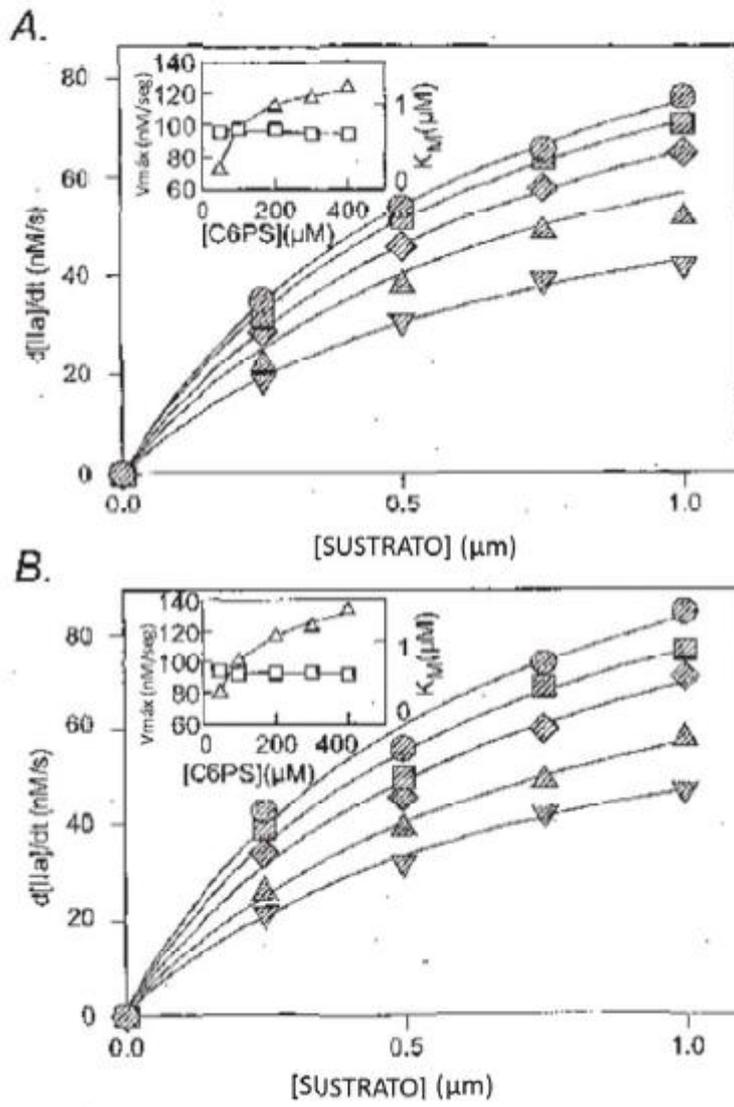


FIGURA 5

FIGURA 6A

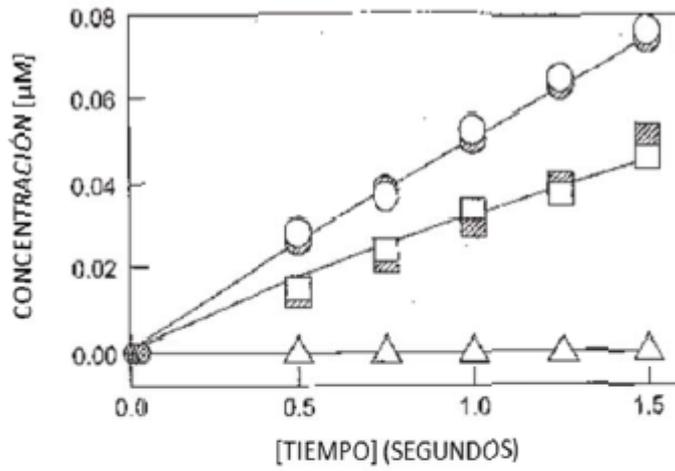
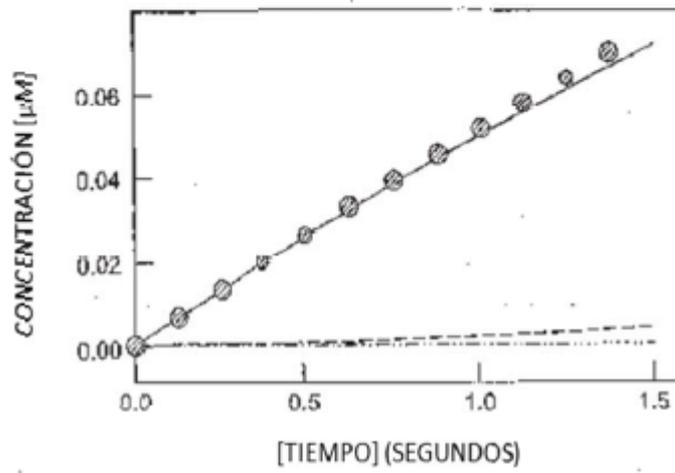


FIGURA 6B



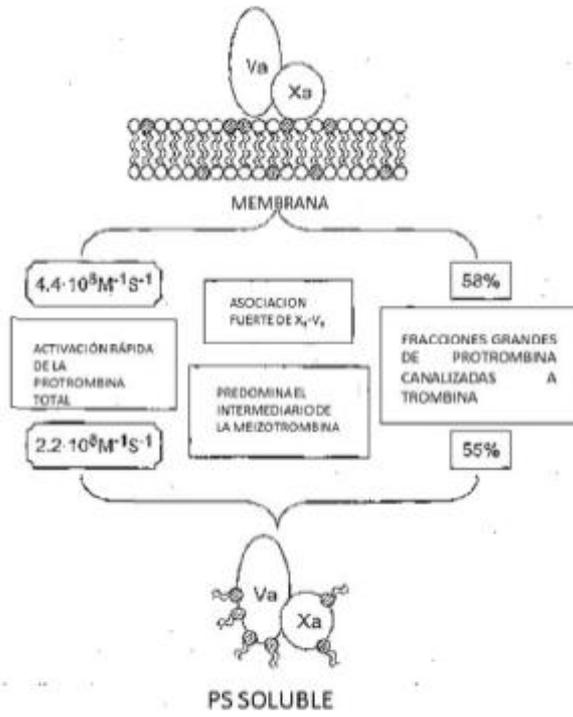


FIGURA 7

7/12

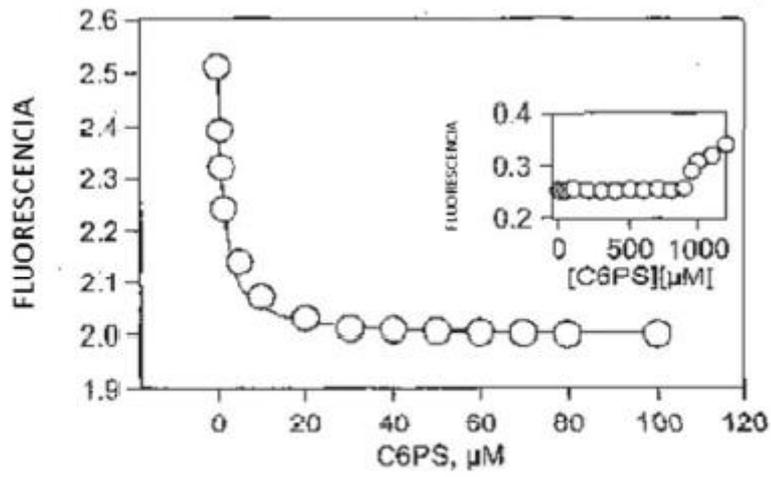


FIGURA 8

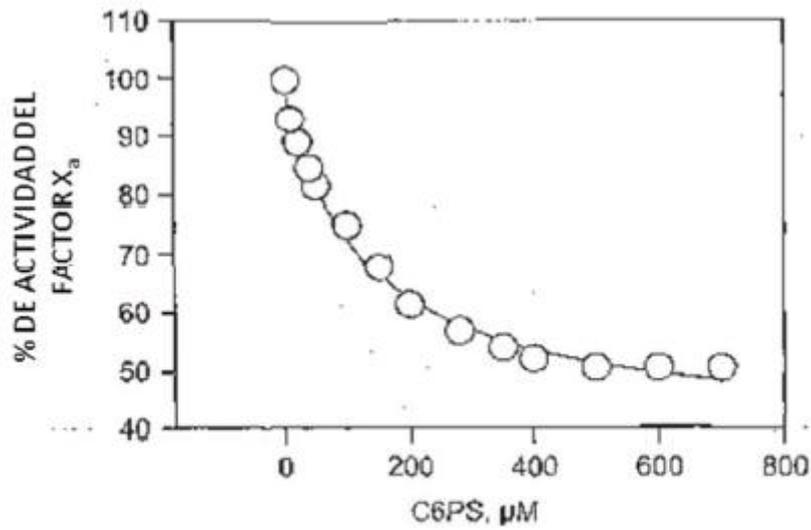


FIGURA 9

8/12

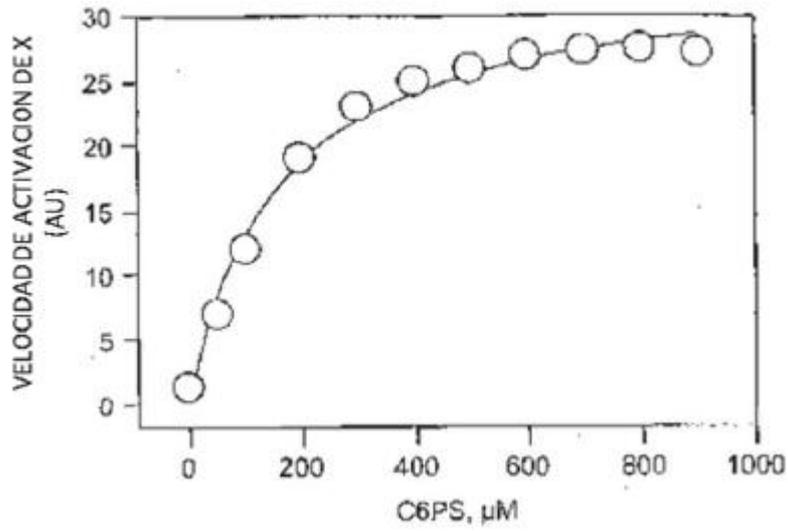


FIGURA 10

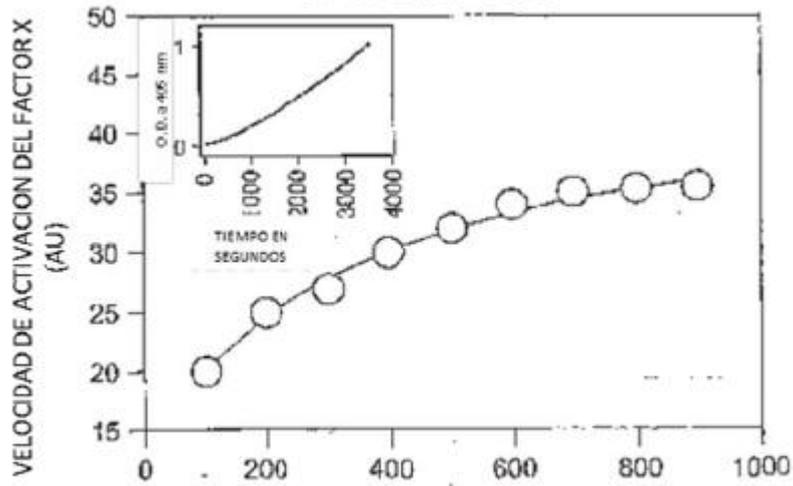


FIGURA 11

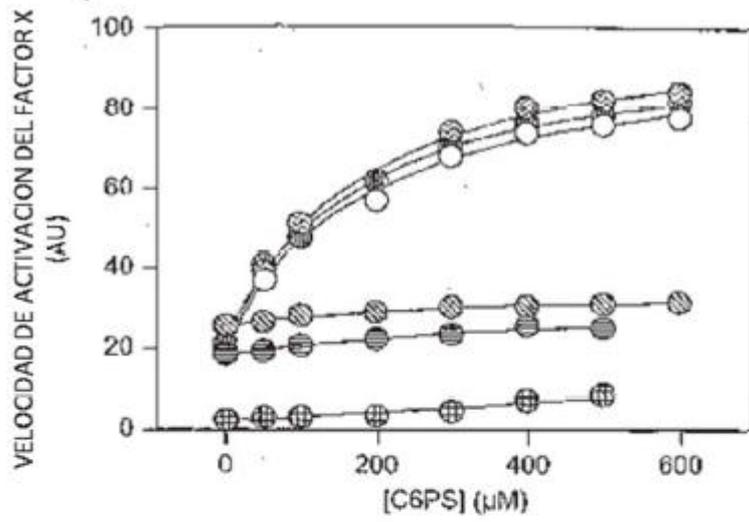


FIGURA 12

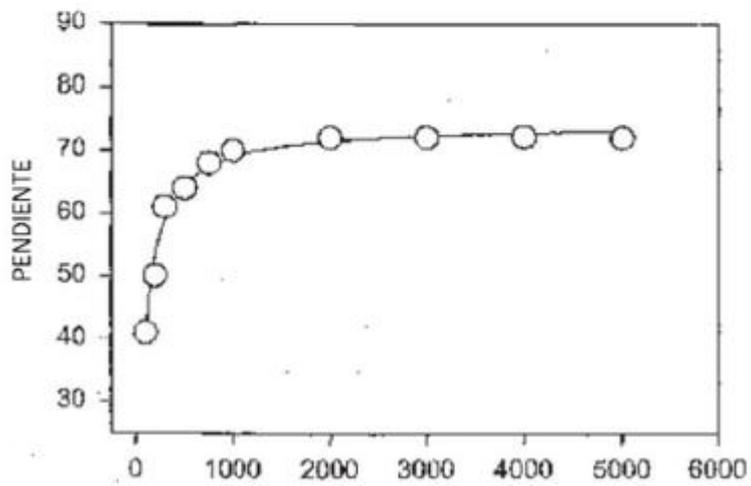


FIGURA 13

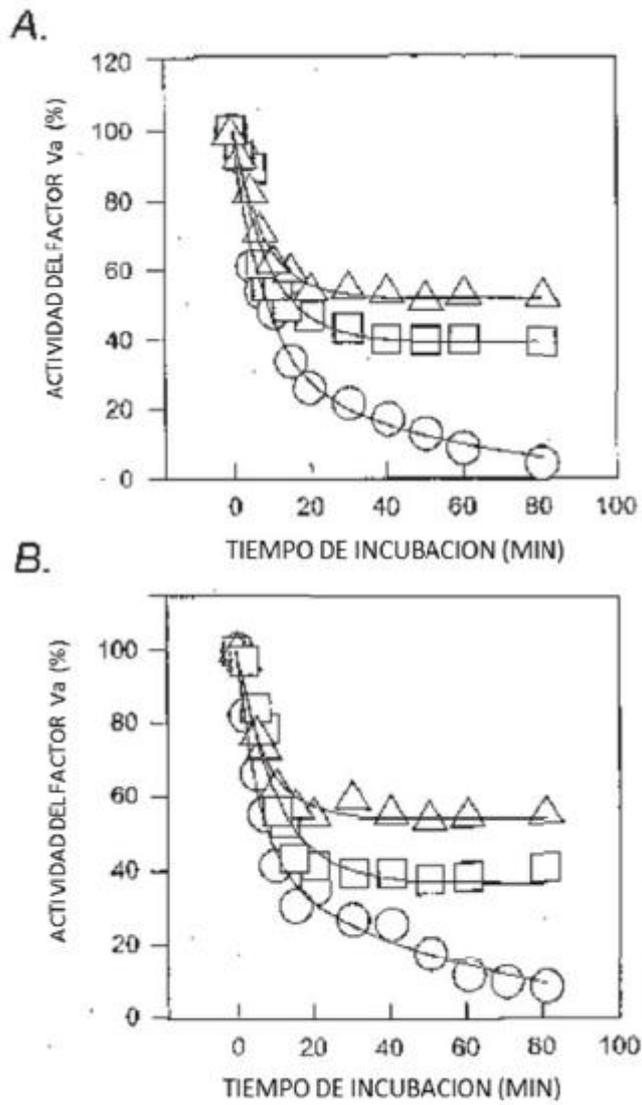


FIGURA 14

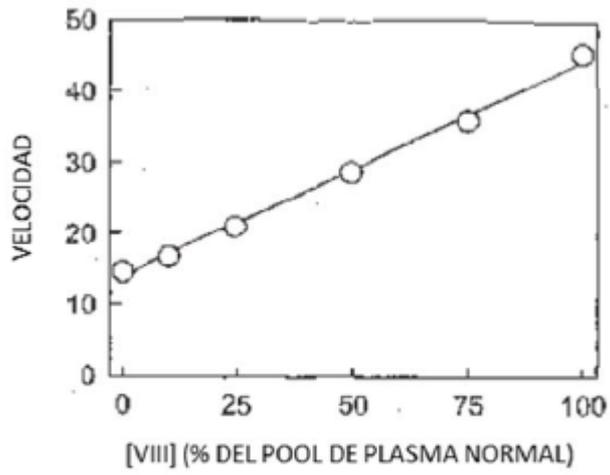


FIGURA 15

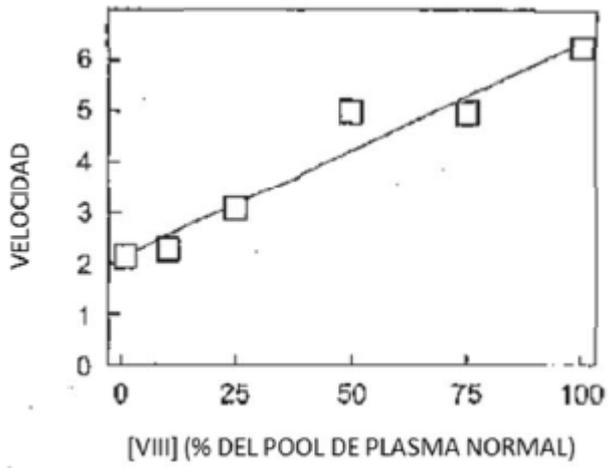


FIGURA 16

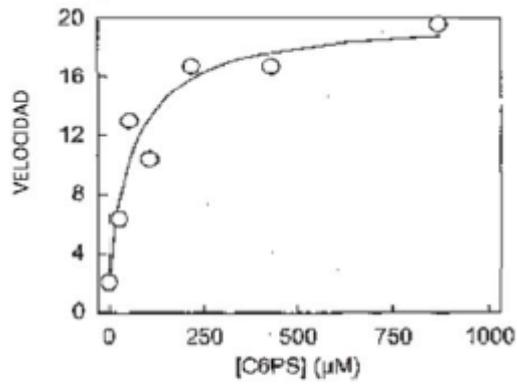


FIGURA 17