

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 612**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013** E 13157111 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016** EP 2772762

54 Título: **Procedimiento para la determinación de la actividad de proteína S.**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.06.2017**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**PATZKE, JUERGEN DR.;  
MEUER, JOERN DR. y  
WISSEL, THOMAS DR.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 617 612 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**

Procedimiento para la determinación de la actividad de proteína S

La invención está en el campo del diagnóstico por coagulación y se refiere a un procedimiento in vitro para la determinación de la actividad de proteína S.

- 5 El sistema de coagulación sanguínea satisface dos objetivos opuestos: por un lado cuida mediante mecanismos de anticoagulación que se mantenga una corriente sanguínea continua correcta; por otro lado, en el caso de una herida vascular mediante mecanismos de procoagulación, garantiza que tiene lugar un cierre de la herida.

Para la activación del sistema de coagulación como consecuencia de una herida vascular, mediante un sistema tipo cascada de proteasas activadoras, surge finalmente la proteasa activa trombina (factor IIa). La formación de trombina inicialmente sólo muy lenta, es acelerada mediante la trombina en sí misma, en lo cual se activan los cofactores factor V y VIII, mediante escisión proteolítica. Los cofactores activados factor Va y VIIIa forman sobre superficies de fosfolípidos con las proteasas factor Xa y IXa, un complejo enzima-cofactor cuya actividad activadora de trombina es aproximadamente 1000 veces más alta que la actividad de las proteasas singulares. Mediante este acoplamiento inverso positivo se llega a un surgimiento explosivo de grandes cantidades de trombina. La trombina transforma el fibrinógeno hasta fibrina, la cual forma polímeros y conduce al cierre de la herida.

Para impedir un aumento de la coagulación peligroso para la salud, que pudiese conducir a un cierre del sistema circulatorio en el cuerpo, tiene que inactivarse la trombina formada, como también prevenirse la formación de más trombina. La trombina activa es neutralizada mediante la formación de complejo con inhibidores de trombina como por ejemplo antitrombina. La formación de más trombina es moderada mediante la trombina en sí misma. La trombina se une a la proteína de membrana trombomodulina. El complejo celular trombina-trombomodulina activa el inhibidor de proteína Proteína C (PC) hasta dar Proteína Ca (Proteína C activada, APC). La APC inactiva los factores Va y VIIIa y regula con ello la formación de trombina. Para su óptimo efecto inhibidor de la coagulación, la APC requiere, entre otras, de proteína S como cofactor.

La proteína S es una proteína de plasma dependiente de la vitamina K. En la sangre, la proteína S está unida parcialmente a la proteína que se une a C4b (C4b-BP). Sólo aproximadamente 40 % de la proteína S presente, ocurre como proteína S libre, no unida. Sólo la proteína S libre estimula la inactivación de factor Va y VIIIa mediante APC. Esta actividad inhibidora de la coagulación de la proteína S es denominada también como actividad de cofactor de proteína Ca o actividad de cofactor de APC.

Aparte de la actividad de cofactor de proteína Ca, que conduce a la inactivación de factor Va y VIIIa, la proteína S libre puede inhibir también directamente el complejo protrombinasa de procoagulación y el complejo tenasa de procoagulación, en lo cual se une al factor Va y al factor Xa. Esta segunda actividad inhibidora de la coagulación de la proteína S es denominada también como actividad independiente de APC (van Wijnen, M. et al., A plasma coagulation assay for an activated protein C-independent anticoagulant activity of protein S. Thromb Haemost 1998, 80: 930-035).

De acuerdo con ello, la proteína S tiene una importante función inhibidora en el sistema de coagulación. Una falta de proteína S o una actividad reducida de proteína S son factores reconocidos de riesgo para una trombofilia. En particular, la actividad de proteína S es un importante marcador para la evaluación de un riesgo de trombosis.

La determinación de la actividad de proteína S en el laboratorio clínico ocurre frecuentemente mediante la determinación de la actividad del cofactor de proteína Ca de la proteína S. Para ello, comúnmente se mezcla la muestra con una cantidad estandarizada de proteína C activada, y se activa la coagulación, mediante lo cual surge el factor Va, el cual es inhibido mediante la proteína C activada añadida. La proteína S presente en la muestra actúa como cofactor para la proteína C activada. Cuanto mayor sea la actividad de proteína S en la muestra, mayor será el tiempo de coagulación de la formulación de reacción. Son por ejemplo pruebas conocidas, obtenibles comercialmente, la prueba de la proteína S Ac de Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania o la prueba de coagulación STA de proteína S de Diagnostica Stago, Francia.

Es un problema, que diferentes magnitudes de influencia pueden perjudicar la determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de la proteína S y pueden conducir a falsos resultados de medición.

Una magnitud de influencia conocida es una mutación que ocurre frecuentemente de factor V en la posición de escisión de la proteína Ca del factor V (dolencia del factor V), que conduce a que el factor Va ser resistente contra la proteína C activada (resistencia a APC), es decir que él ya no pueda ser inactivado por la proteína Ca. En muestras de pacientes con una mutación de dolencia (no reconocida) de factor V, la proteína S puede no desarrollar su efecto de refuerzo a la proteína Ca, en lo cual comienza la reacción de coagulación sin impedimentos, de modo que se determina una falsa actividad muy baja de proteína S. Para excluir la perturbación de la mutación de dolencia de factor V, en el estado de la técnica se sugiere que a la muestra se agregue factor Va

ya activado (Wolf, M. et al., A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate. *Thromb Haemost.* 1989, 62(4): 1144-1145 y STA protein S Clotting Test).

Otra dimensión conocida de influencia es la presencia de trombocitos en la muestra. En muestras de plasma, que por procesamiento inadecuado contienen más de 10.000 trombocitos/mL, existe el peligro de que se determine una actividad falsa muy baja de proteína S (Patzke, J. et al., Characterization of a protein S assay measuring the APC cofactor activity. *J Lab Med* 2007, 31(6): 262-272).

Aún otra dimensión conocida de influencia son anticuerpos antifosfolípidos presentes en la muestra de pacientes, en particular aquellos que interfieren el tiempo de coagulación in vitro de la muestra del paciente (anticoagulantes de lupus). En muestras de pacientes con un síndrome (no reconocido) antifosfolípido puede superponerse el efecto de la proteína S de prolongación del tiempo de coagulación de anticoagulantes de lupus, de modo que se determina una actividad falsa muy alta de proteína S.

El objetivo de la presente invención consiste en mejorar un procedimiento conocido para la determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de la proteína S, en el cual se mezcla la muestra con proteína C activada o una sustancia para la activación de proteína C y con factor Va o una sustancia para la activación directa o indirecta de factor V hasta dar una formulación de reacción y se mide la reacción de coagulación en la formulación de reacción, de modo que se elimina la influencia de cualquier perturbación, de modo que puede determinarse específicamente la verdadera actividad de proteína S de la muestra.

El objetivo se logra mediante la mezcla de la muestra en una segunda formulación de reacción adicionalmente a los mismos componentes que son usados para la preparación de una primera formulación de reacción, con un inhibidor, el cual inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, y la medición de la reacción de coagulación en la formulación de reacción y entonces determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, en lo cual se forma el cociente de la reacción de coagulación que fue medido en la primera formulación de reacción, y la reacción de coagulación que fue medido en la segunda formulación de reacción.

La adición de un inhibidor que inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, a la segunda formulación de reacción, provoca que la actividad de proteína S en la formulación de reacción sea igual o cercana a 0 %, mientras la influencia de cualquier perturbación en la muestra, como por ejemplo dolencia de factor V, muy alto número de trombocitos o anticuerpos antifosfolípidos, permanece sin modificación en la reacción de coagulación de la formulación de reacción. En la segunda formulación de reacción se mide por consiguiente sólo la influencia de cualquier perturbación. Mediante la formación del cociente de los resultados de prueba de la primera y segunda formulaciones de reacción, se elimina la influencia de cualquier perturbación, y es cuantificable la actividad real de proteína S.

Se entiende por un "inhibidor que inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S", toda sustancia que inhibe al menos la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, como por ejemplo anticuerpos monoclonales que se unen a proteína S o fragmentos de anticuerpos monoclonales que se unen a proteína S, que fueron producidos mediante procedimientos conocidos, adecuados para la preparación de anticuerpos monoclonales y fueron seleccionados de acuerdo con su capacidad para inhibir la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S (véase también ejemplo 1). Otra sustancia adecuada es proteína que se une a C4b (C4b-BP), que se une a la proteína S libre y mediante ello la inactiva.

Un inhibidor preferido que inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, es un anticuerpo monoclonal que se une a la proteína S y que es producido por la línea de células de hibridoma 96-168/01. Esta línea de células de hibridoma fue depositada el 7 de noviembre de 2012 en el Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, bajo el número de acceso DSM ACC3188. Además se prefieren fragmentos de anticuerpo monoclonal que se une a proteína S, producido por la línea de células de hibridoma 96-168/01.

Otro objetivo descrito en el documento es la línea de células de hibridoma, que fue depositada en el DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC3188 así como el anticuerpo que fue producido por la línea de células de hibridoma DSM ACC 3188, así como fragmentos de él que se unen a proteína S. En el sentido de la invención, se entiende por una "muestra", un material que presumiblemente contiene la proteína S que va a ser determinada. El concepto de muestra se refiere a líquidos corporales humanos o animales, especialmente sangre y plasma, preferiblemente plasma pobre en plaquetas.

En formas de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en las cuales se mezcla la muestra con proteína C activada, se usa preferiblemente proteína Ca humana purificada. De modo alternativo puede mezclarse la muestra con una sustancia para la activación de la proteína C, que puede activar la proteína C en la muestra y/o cualquiera añadida a la muestra. Son sustancias adecuadas para la activación de proteína C por ejemplo trombina, preferiblemente trombina o bovina, o un activador de proteína C del veneno de serpientes, preferiblemente de

veneno de serpientes del género *Agkistrodon contortrix*.

En formas de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en las cuales a la muestra se añade factor Va, se usa preferiblemente factor Va humano o bovino purificado o factor Va purificado de conejo. De modo alternativo a ello, puede mezclarse la muestra con una sustancia para la activación directa o indirecta de factor V.

5 Para la activación directa de factor V son adecuadas en particular trombina, preferiblemente trombina humana o bovina, o un activador de factor V de veneno de serpientes, preferiblemente activador del factor V de veneno de serpiente del género *Vipera russelli*. Para la activación indirecta de factor V son adecuadas en particular sustancias del grupo de los activadores de fase de contacto, como por ejemplo caolín, sílice, vidrio o ácido elálgico, o tromboplastina. Otra sustancia para la activación indirecta de factor V es un activador de protrombina, preferiblemente el activador de protrombina de veneno de serpientes del género *Echis carinatus*. Aún otra sustancia para la activación indirecta de factor V es un activador de factor X de veneno de serpientes, preferiblemente activador de factor X del veneno de serpiente del género *Vipera russelli*.

10 En otra forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, puede mezclarse la muestra adicionalmente con un plasma carente de proteína S. Esto tiene como ventaja que se compensa cualquier otra carencia de factores en la muestra de paciente que va a ser investigada y no tiene influencia en los resultados de la prueba.

La reacción de coagulación en la primera y en la segunda formulación de reacción puede ser medida mediante determinación del momento de coagulación. Para ello se mide en segundos el tiempo desde el momento de adición de factor Va o la sustancia para la activación directa o indirecta de factor V a la muestra o bien a la formulación de reacción, hasta la formación de un coágulo identificable de fibrina. De modo alternativo puede usarse un sustrato cromógeno para trombina y medir el intervalo de tiempo desde la adición de factor Va o la sustancia para la activación directa o indirecta de factor V a la muestra, hasta alcanzar una velocidad de cambio de absorción definida.

20 El tiempo de coagulación puede ser determinado mediante métodos manuales o automáticos. En la determinación automática es adecuada la medición de una propiedad mecánica u óptica de la formulación de reacción, por ejemplo la viscosidad o turbidez. En casos de medición automática, comúnmente se mide de manera continua una propiedad de la formulación de reacción, y a partir de la modificación de la propiedad en función del tiempo, con ayuda de procedimientos de valoración puede determinarse el tiempo de coagulación como punto final.

25 Se determina la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S de acuerdo con la invención, mediante la formación del cociente de la reacción de coagulación que fue medida en la primera formulación de reacción en ausencia de un inhibidor específico de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, y la reacción de coagulación que fue medida en la segunda formulación de reacción en presencia de un inhibidor específico de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S. Cuanto mayor es el cociente determinado, mayor es la actividad del cofactor de proteína Ca de proteína S en la muestra. Mediante la comparación del cociente determinado para una muestra de paciente con una curva de calibración adecuada, se determina la actividad de proteína S.

Descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 muestra la inhibición de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en plasma normal, mediante anticuerpo monoclonal MAK49 (rectángulo no lleno) en comparación con la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en plasma normal sin inhibidor (rectángulo lleno). Tiempos de coagulación de 143 s corresponden a 100 % de actividad de proteína S, tiempos de coagulación de 96 s corresponden a 0 % de actividad de proteína S (plasma carente de proteína S, línea discontinua). Desde una concentración de aproximadamente 300 a 500 nM MAK49 en la formulación de reacción se alcanza una inhibición máxima de actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S. Se entiende por "inhibición depurada" (asteriscos) la inhibición que se restaura exclusivamente en presencia de MAK49. La inhibición condicionada aparente por dilución fue determinada mediante adición de cantidades correspondientes de amortiguador sin MAK49 (rectángulo lleno), y la inhibición total (rectángulo no lleno) fue depurada a los valores correspondientes.

Figura 2

La figura 2 muestra una curva de calibración para los cocientes (relación) de los tiempos de coagulación en ausencia y en presencia del anticuerpo monoclonal MAK49 que inhibe proteína S, contra la actividad de proteína S (en % del estándar). La curva de calibración sirve para derivar de manera directa actividades de proteína S en % del estándar, a partir del resultado del procedimiento de acuerdo con la invención, con formación de cocientes de una muestra desconocida.

Figura 3

La figura 3 despliega para muestras de 5 donantes con dolencia de mutación FV homocigótica, la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S (tiempo de coagulación) en ausencia del inhibidor MAK49 (barra punteada), la cantidad de antígeno de proteína S libre (barra de tiras longitudinales) y los cocientes de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S (tiempo de coagulación) medida en ausencia de MAK49 y la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S (tiempo de coagulación) medida en presencia de MAK49 (barras con tiras transversales). La muestra número 4 proviene de un paciente que fue tratado adicionalmente con un anticoagulante oral.

### Ejemplos

**Ejemplo 1:** preparación de un anticuerpo monoclonal antiproteína S, que inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S

Se usó proteína S humana coagulada como antígeno de inmunización. Se inyectaron por vía intraperitoneal en cada caso a seis ratones, 20 µg de antígeno de inmunización (proteína S). Después de varias semanas se sacrificaron los ratones, y se tomaron los bazos y se produjeron suspensiones individuales de células. Se realizó fusión de las células de los bazos con células de mieloma (Sp2/0), y se transfirieron las células de hibridoma así obtenidas a placas de cultivo celular de microtitulación. Se probó la especificidad de los anticuerpos dejados en el sobrenadante del cultivo celular, en una primera etapa con ayuda de placas de microtitulación recubiertas con proteína S humana (recubrimiento 1 µg/ml = 0,15 pg/depresión). A cada depresión se transfirió con pipeta una alícuota de un sobrenadante de cultivo celular. Después de un tiempo de incubación se retiró el sobrenadante, y se lavó cada depresión con amortiguador. A continuación se transfirió con pipeta a cada depresión una solución que contenía un anticuerpo anti-ratón-IgG acoplado con peroxidasa. Después de un tiempo de incubación y lavado de las depresiones con amortiguador de lavado, se añadió a cada depresión una alícuota de una solución de TMB cromogénico, y se midió la reacción de color a 405 nm.

A continuación se probó el anticuerpo monoclonal obtenido después de la clonación, que se une de manera específica a la proteína S, respecto a su capacidad de inhibir la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S. Para ello se añadieron a plasma normal concentraciones crecientes del anticuerpo monoclonal antiproteína S, y se midió la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en las muestras de plasma (para la medición de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S véase ejemplo 2). De modo paralelo se añadió a plasma normal, proteína purificada que se une a C4b (C4b-BP), y se midió la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S.

Los anticuerpos, con los cuales puede alcanzarse una inhibición de la actividad de proteína S, que corresponde a la inhibición de la actividad de proteína S, que es causada por 100 nMol/L de proteína que se une a C4b (C4b-BP) en plasma normal, son adecuados como inhibidores de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S. Se prepara un anticuerpo monoclonal ("MAK49") identificado de este modo, de la línea de células de hibridoma 96-168/01. Esta línea de células de hibridoma fue depositada el 7 de noviembre de 2012 en el Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, bajo el número de acceso DSM ACC3188.

La figura 1 muestra la inhibición de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en plasma normal, por el anticuerpo monoclonal MAK49 (rectángulo no lleno) en comparación con la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en plasma normal sin inhibidor (rectángulo lleno). Se midió el tiempo de coagulación como se describe en el ejemplo 2. Tiempos de coagulación de 143 s representan 100 % de actividad de proteína S, tiempos de coagulación de 96 s representan 0 % de actividad de proteína S (plasma carente de proteína S, línea punteada). Desde una concentración de aproximadamente 300 a 500 nM MAK49 en la formulación de reacción, se alcanza una inhibición máxima de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S. Se entiende por "inhibición depurada" (asteriscos) la inhibición que se restaura exclusivamente en presencia de MAK49. La inhibición condicionada aparente por dilución fue determinada mediante adición de cantidades correspondientes de amortiguador sin MAK49 (rectángulo lleno), y la inhibición total (rectángulo no lleno) fue depurada a los valores correspondientes.

**Ejemplo 2:** Calibración de la actividad de proteína S de diferentes muestras con actividad conocida de proteína S contra los cocientes de los tiempos de coagulación de las muestras en ausencia y en presencia de un inhibidor de proteína S

Procedimiento para la determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S

Para la determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en ausencia o bien en presencia de un inhibidor que inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, se mezclaron 95 µl de muestra con 5 µl de amortiguador o bien con 5 µl de solución de inhibidor (MAK49 10 µM) y se incubó por aproximadamente tres minutos. Se diluyeron entonces las muestras 1:7 con plasma carente de proteína S. Se mezclaron 16 µL de esta dilución una vez con 27 µL de plasma carente de proteína S, y después de 20 segundos de incubación se añadieron 58 µL de un reactivo APC que contiene proteína C humana activada (APC) y cloruro de calcio. Después de otros 110 segundos de duración, para iniciar la reacción de coagulación se añadieron 145 µL de un reactivo

activador, el cual contiene veneno Russells Viper (RVV, veneno de *Vipera russelli*) y fosfolípidos, para la activación de factor X a factor Xa, el cual nuevamente activa factor V a factor Va.

5 La determinación de la actividad de proteína S ocurre según el siguiente principio: APC escinde de manera proteolítica al factor Va, el cual surge en la activación de la cascada de coagulación mediante RVV. La proteína S actúa al respecto como cofactor, el cual acelera la reacción considerablemente. Mediante ello se llega a un tiempo de coagulación creciente de manera proporcional a la actividad de proteína S en la muestra. La adición de plasma carente cuida de un suficiente suministro a la formulación de fibrinógeno, factor V y los otros factores de coagulación necesarios. La coagulación se pone en marcha en la etapa del factor X mediante el activador de factor X de RVV. El factor Xa forma bajo mediación del factor Va aún remanente, trombina a partir de protrombina. La trombina se transforma finalmente en fibrinógeno.

10 El momento de coagulación fue determinado ópticamente.

Se prepararon muestras de plasma con diferentes concentraciones de proteína S, en lo cual se mezcló plasma humano normal con una actividad de proteína de 90 % del estándar, con plasma carente de proteína S con una actividad de proteína S de 0 % (muestras de plasma con 90 %, 67,5 %, 45 %, 22,5 % y 0 % de actividad de proteína S), y se examinaron las muestras con el procedimiento descrito anteriormente.

Para cada muestra se determinó el tiempo de coagulación en ausencia y en presencia del anticuerpo monoclonal MAK49 que inhibe la proteína S, el cual inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, y se formó el cociente del tiempo de coagulación medido en ausencia de MAK49 y tiempo de coagulación medido en presencia de MAK49. Se realizó una gráfica de los cocientes así determinados, contra la actividad conocida de proteína S de las muestras, y la curva resultante sirvió como curva de calibración para la medición de muestras con actividades desconocidas de proteína S. En la figura 2 se muestra la curva de calibración.

**Ejemplo 3:** determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en muestras de donantes con dolencia de mutación FV homocigótica

25 Se descongelaron en el baño de agua a 37 °C por 15 min, muestras de plasma congeladas de cinco donantes con dolencia de mutación FV homocigótica, y se midió la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en presencia y en ausencia de MAK49 (como se describe en el ejemplo 2). Además se determinó en cada muestra con un inmunoensayo, la cantidad de antígeno de proteína S libre. En la figura 3 se representan los resultados de manera comparativa.

30 La figura 3 enseña para cada muestra la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en ausencia del inhibidor MAK49 (barras punteadas), la cantidad de antígeno de proteína S libre (barras con líneas longitudinales) y los cocientes de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S (tiempo de coagulación) medida en ausencia del MAK49 y la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S (tiempo de coagulación) medida en presencia de MAK49 (barras con líneas transversales).

35 En muestras de pacientes con una dolencia de mutación de factor V la proteína S no puede desarrollar su acción de refuerzo de proteína Ca, en lo cual da inicio la reacción de coagulación sin impedimento, de modo que se determina un tiempo de coagulación muy corto y con ello una falsa actividad muy baja de proteína S. Esto es claro en particular mediante la comparación con la concentración medida de antígeno de proteína S. La formación de cociente según el procedimiento de acuerdo con la invención muestra sin embargo una mejor comparabilidad con los resultados de la determinación de antígeno de proteína S. La única excepción es una muestra, que proviene de un paciente con dolencia de factor V homocigótico, que adicionalmente es tratado con un anticoagulante oral (muestra número 4). Aquí se reduce de manera similar la actividad de proteína S, tanto en la prueba de actividad de cofactor de proteína Ca como también en el procedimiento de acuerdo con la invención con formación de cocientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la determinación de la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S en una muestra de líquido corporal humano o animal, en el que
  - a. en una primera formulación de reacción se mezcla la muestra con
    - 5 i. proteína C activada o una sustancia para la activación de proteína C y
    - ii. factor Va o una sustancia para la activación directa o indirecta de factor V
  - b. y en el que se mide la reacción de coagulación en la formulación de reacción, caracterizado porque en una segunda formulación se mezcla la muestra, adicionalmente a los mismos componentes que son usados para la preparación de la primera formulación de reacción, con un inhibidor que
    - 10 inhibe la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S y se mide la reacción de coagulación en la formulación de reacción y entonces se determina actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, en lo cual se forma el cociente de la reacción de coagulación que fue medida en la primera formulación de reacción, y la reacción de coagulación que fue medida en la segunda formulación de reacción.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la primera y la segunda formulación de reacción se mezcla la muestra adicionalmente con plasma carente de proteína S.
  - 15
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína C activada, que se mezcla con la muestra, es proteína Ca humana purificada.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-2, en el que la sustancia para la creación de
  - 20 proteína C es trombina o un activador de proteína C de veneno de serpiente, preferiblemente de veneno de serpiente del género Agkistrodon contortrix.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la sustancia para la activación directa de factor V es trombina o un activador de factor V de veneno de serpiente, preferiblemente el activador de factor V del veneno de serpiente del género Vipera russelli.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, en el que la sustancia para la activación indirecta
  - 25 de factor V es un activador de fase de contacto, preferiblemente en activador de fase de contacto del grupo de caolín, sílice, vidrio y ácido eláxico.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, en el que la sustancia para la activación indirecta de factor V es tromboplastina.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, en el que la sustancia para la activación indirecta
  - 30 de factor V es un activador de protrombina, de forma más preferida el activador de protrombina del veneno de serpiente del género Echis carinatus.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, en el que la sustancia para la activación indirecta de factor V es un activador de factor X, de manera más preferida el activador de factor X del veneno de serpiente del género Vipera russelli.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, en el que el factor Va, que se mezcla con la
  - 35 muestra, es factor Va humano o bovino purificado o factor Va purificado de conejo.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor que inhibe de manera específica la actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, es un anticuerpo que se une a la proteína S o un fragmento de anticuerpo que se une a la proteína S o proteína que se une a C4b.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el inhibidor que inhibe de manera específica la
  - 40 actividad de cofactor de proteína Ca de proteína S, es un anticuerpo que se une a la proteína S, que es producido por la línea de células de hibridoma DSM ACC3188, o un fragmento de él que se une a la proteína S.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que se mide la reacción de
  - 45 coagulación en la primera y en la segunda formulación de reacción, mediante determinación del momento de coagulación.

FIG 1

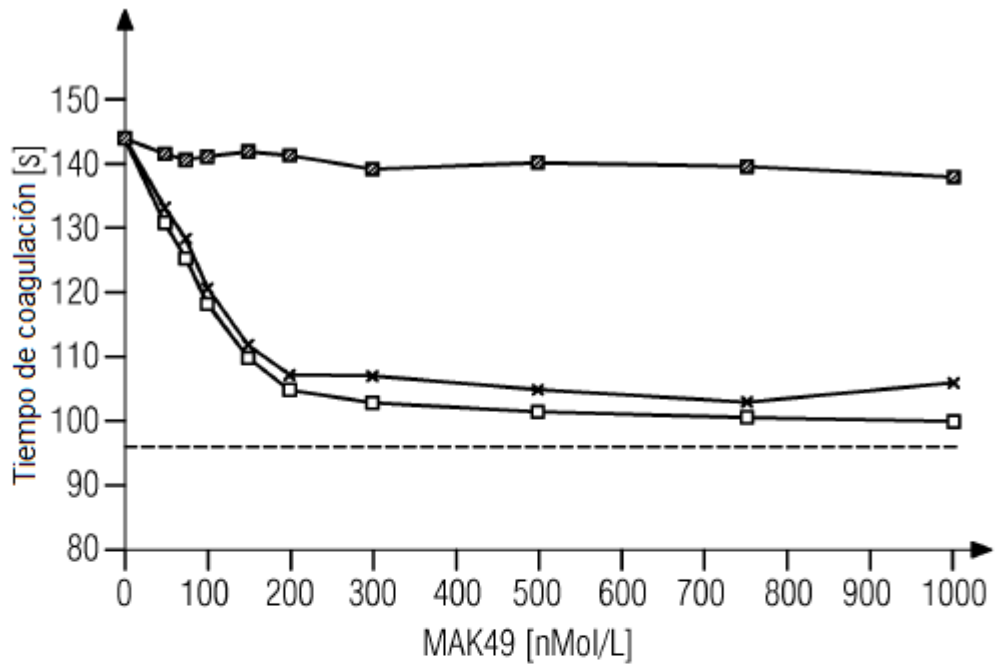


FIG 2

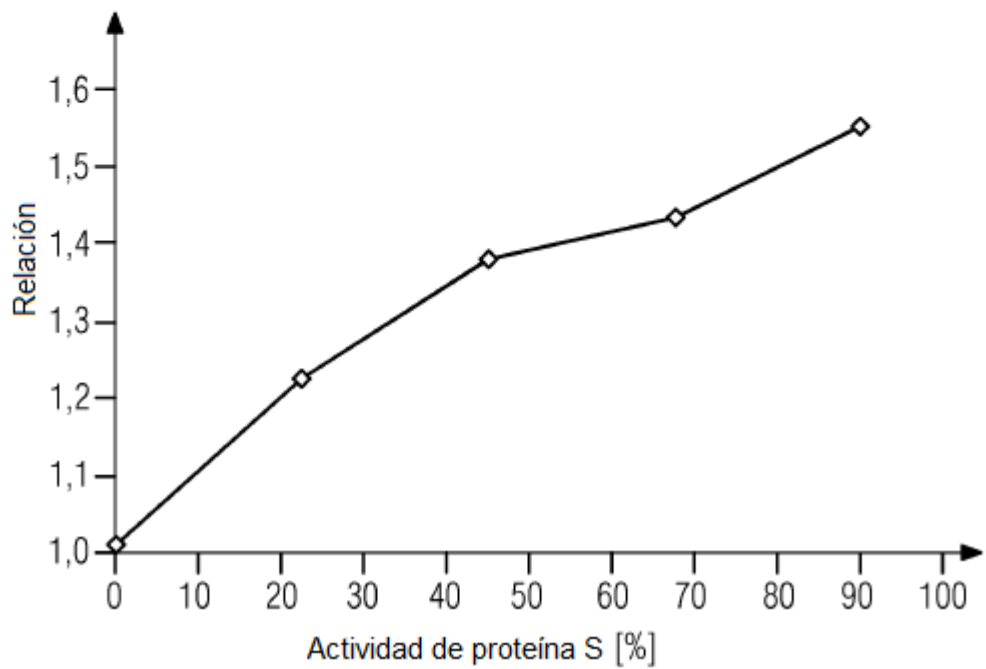




FIG 3

