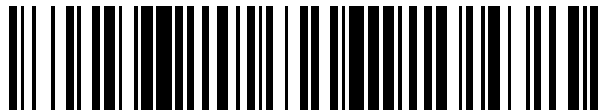


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 318**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2012 PCT/IS2012/050005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2012 E 12748059 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2684056**

54 Título: **Procedimiento para la monitorización de una terapia anticoagulante**

30 Prioridad:

08.03.2011 IS 50010

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**FLIX DIAGNOSTICS (100.0%)
Kleifarvegi 12
104 Reykjavik, IS**

72 Inventor/es:

**ONUNDARSON, PALL TORFI y
GUDMUNDSDOTTIR, BRYNJA R.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 636 318 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 monitorización de una terapia anticoagulante

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está dentro del campo del diagnóstico médico y la monitorización de fármacos, específicamente el campo de la medición de la coagulación sanguínea en pacientes que toman compuestos farmacéuticos para la terapia de anticoagulación.

10

ANTECEDENTES TÉCNICOS Y TÉCNICA ANTERIOR

[0002] La coagulación de la sangre es el mecanismo que impide continuar la pérdida de sangre cuando cualquier parte del sistema de circulación de la sangre está lesionada. Implica la formación de una masa semisólida de material sanguíneo, que actúa para tapar heridas de los vasos. El sistema comprende una serie de componentes que interactúan en la sangre y en la pared del vaso que deben permanecer en equilibrio; un sistema inactivo provoca el riesgo de hemorragia severa y fatal, mientras que la actividad excesiva del sistema de coagulación de la sangre provoca el riesgo de formación de coágulos de sangre (trombosis y tromboembolia) dentro del sistema circulatorio, obstrucción de arterias, con consecuencias potencialmente mortales debido a la necrosis de los tejidos (muerte celular).

20

[0003] Los anticoagulantes o "diluyentes de la sangre" están entre las clases de fármacos más administrados con frecuencia y dentro de esta clase, los antagonistas de la vitamina K (AVK, cumarinas) han sido hasta hace poco los únicos agentes orales disponibles. Debido al delicado equilibrio del sistema de coagulación de la sangre y mucha variación en la sensibilidad del paciente y la capacidad de respuesta a la terapia, las dosis de AVK tienen que ajustarse cuidadosamente y monitorizarse de forma continua, ya que la respuesta del paciente y la dosis adecuada cambia con frecuencia con el tiempo. Se estima que se realizan anualmente 800 millones de pruebas en todo el mundo para monitorizar la coagulación de la sangre en los pacientes sobre los AVK.

25

[0004] El sistema de coagulación de la sangre comprende un sistema complejo de proenzimas, enzimas y cofactores interrelacionados, que realizan su papel en la superficie de las plaquetas activadas y las células endoteliales y en los vasos rotos en el cuerpo humano. Cuando se activa el sistema, por lo general en la herida de un vaso, el resultado final es la formación de un coágulo de sangre que contiene una malla de fibrina insoluble. En el cuerpo, el proceso de coagulación se controla cuidadosamente sobre la superficie de las plaquetas activadas y las células endoteliales, pero en el laboratorio de pruebas, la superficie de las plaquetas se suele sustituir por fosfolípidos adecuados. Las proenzimas, enzimas y cofactores se denominan tradicionalmente factores de coagulación (F), la mayoría de los cuales se forman en el hígado.

35

[0005] Los factores de coagulación dependientes de la vitamina K y los antagonistas de la vitamina K: Cuatro factores de coagulación, es decir, FII, FVII, FIX y FX, que se forman en el hígado, son inactivos a menos que después de la síntesis se carboxilen además por un proceso de enzima dependiente de la vitamina K en el hígado. En pacientes con deficiencia de vitamina K o en pacientes tratados con un antagonista de la vitamina K (AVK), la cantidad de factores dependientes de la vitamina K (VKD) carboxilados se reduce y, por lo tanto, también la capacidad de coagulación (coagulabilidad) de la sangre del paciente correspondiente. A menos que el efecto de los AVK esté controlado, esto puede conducir a una hemorragia interna grave e incluso mortal. Pero mediante la reducción de los niveles de factores VKD de una manera controlada, la coagulación anormal de la sangre dentro de los vasos (trombosis) se puede prevenir y reducir al mínimo el riesgo de sangrado. Por tanto, es imperativo que el efecto de los AVK esté controlado con pruebas de coagulación adecuadas. Basándose en los resultados de pruebas, la dosis se puede ajustar maximizando el efecto antitrombótico y, al mismo tiempo, minimizando el riesgo de sangrado anormal causado por la sobreanticoagulación.

50

[0006] La monitorización de la actividad de coagulación de la sangre en pacientes tratados con AVK durante sesenta años se ha basado en la medición del tiempo de protrombina (PT), bien como el PT Quick original (PT) (Quick, A., J Bio Chem 1935 (109): pág. 73-4) o como su modificación, PT de Owren (también conocido como PP, prueba P & P o prueba de complejo de protrombina) (Owren y Aas Scand J Clin Lab Invest, 1951. 3 (3): pág. 201-8). La prueba de PT mide la actividad de coagulación de tres de los cuatro factores de coagulación dependientes de la vitamina K (es decir, FII, FVII, y FX), así como del fibrinógeno (factor I) y el factor V, en una muestra de plasma sanguíneo que se agotado en calcio, mediante la adición de un reactivo de coagulación (tromboplastina, factor tisular) y calcio, y posteriormente la medición del tiempo que tarda la sangre en coagular. La última prueba (P & P) es una modificación de PT, donde el plasma adsorbido (totalmente deficiente en factores dependientes de vitamina K) se mezcla en el plasma de prueba, corrigiendo cualquier posible deficiencia de factor V o fibrinógeno y dejando la prueba P & P sólo sensible a los factores II, VII y X. Por lo tanto, la prueba de PT también es sensible a la deficiencia de los factores V y el fibrinógeno, que no son dependientes de la vitamina K y si la deficiencia puede causar confusión en los resultados en pacientes que toman AVK. Con ambas pruebas, sin embargo, el tiempo de coagulación medido es igualmente sensible a una reducción de cualquiera de los tres factores dependientes de la vitamina K que la prueba mide, es decir, FII, FVII y FX. La actividad coagulante de FIX no se mide mediante estas pruebas. Los tiempos de

60

65

coagulación obtenidos con las pruebas basadas en PT se han supuesto en la práctica que reflejan directamente el efecto antitrombótico de AVK en pacientes, excepto durante la iniciación de la terapia con AVK. Sin embargo, éste no siempre puede ser el caso.

5 **[0007]** Costa et al. (Costa I.M., et al. Biomedicine & Pharmacotherapy 64 (2010) 130-132) investigaron la utilidad del factor II y el factor X como marcadores terapéuticos en pacientes en tratamiento con warfarina. En el estudio, se ensayó la actividad de FII o FX mediante la mezcla de las muestras de pacientes con plasma deficiente en FII (o FX), seguido de la adición de tromboplastina y registro del tiempo de coagulación. Los autores utilizaron los valores de INR (de la prueba PT) como referencia y sus resultados indican una relación no proporcional entre los valores de
10 INR y una actividad baja de FII y FX, concluyeron que en estas circunstancias, "la capacidad de predicción y el interés de FII y FX como marcadores de respuesta a la warfarina es insignificante".

15 **[0008]** El documento WO 93/07491 describe un prueba que utiliza trombomodulina soluble para determinar el estado funcional en plasma de las proteínas inhibidoras de la coagulación dependientes de vitamina K, la proteína C y la proteína S. El procedimiento comprende la combinación de una muestra de prueba de plasma de sangre y una sustancia activadora de la coagulación en una solución libre de calcio, a continuación, la adición de trombomodulina y de iones de calcio solubles para iniciar una reacción de coagulación, la medición del tiempo requerido para la coagulación de la muestra de plasma de prueba, la comparación del tiempo de coagulación medido con el de las muestras de plasma de control estándar, incluyendo los controles de plasma deficiente en proteína C y proteína S, y
20 a continuación la utilización de los valores de tiempo de coagulación comparados para determinar el estado funcional de la proteína C y la proteína S en el individuo.

25 **[0009]** El documento WO 2004/102202 describe una mezcla de activación que comprende plasma de sustrato con déficit de factores, un activador y un fosfolípido. Esta mezcla de activación se utiliza en lugar de los componentes individuales en un procedimiento de prueba de una etapa. El activador es preferentemente sílice micronizada y el fosfolípido es preferiblemente fosfolípido sintético.

30 **[0010]** El tiempo de coagulación medido real medido en un individuo normal variará dependiendo del procedimiento aplicado y también del sistema de análisis y los reactivos específicos utilizados. Diferentes reactivos de coagulación e incluso diferentes lotes de factores tisulares (tromboplastina) y proteínas del fabricante utilizados causan la variabilidad en el tiempo de coagulación obtenido con PT o P & P. Por lo tanto, se ha ideado un protocolo para procedimientos de calibración. Cada fabricante asigna un valor de ISI (Índice Internacional de Sensibilidad) para el factor tisular proporcionado. (Ver WHO Guidelines for Thromboplastins and Plasma Used to Control Anticoagulant Therapy, TRS, No. 889, Anexo 3). El valor de ISI indica cómo un lote particular de factor tisular se compara con una muestra estandarizada a nivel internacional. El valor de ISI es por lo general entre 1,0 y 2,0. De este modo, se puede calcular un valor de "relación normalizada internacional" (INR), que es la relación del tiempo de protrombina de un paciente con respecto a la PT de población normal media, elevado a la potencia del valor de ISI para el sistema analítico utilizado. El valor INR en consecuencia puede describirse con la ecuación:

40
$$\text{INR (PT/MNPT)}^{\text{ISI}}$$

donde MNPT se refiere a "tiempo de protrombina normal media". Para propósitos prácticos, el MNPT se obtiene generalmente como un valor medio de los tiempos de protrombina de al menos 20 muestras frescas de individuos sanos. Un nivel alto de INR, como una INR de más de 5, indica que hay una alta probabilidad de hemorragia,
45 mientras que si la INR es de 1,3 o menos, no hay protección contra tener tromboembolismo. Un intervalo de INR normal para una persona sana es 0,8-1,3 y para las personas en tratamiento con cumarina (por ejemplo, warfarina), el intervalo terapéutico más comúnmente recomendado es de 2,0-3,0.

50 **[0011]** La INR objetivo puede ser mayor en determinadas situaciones, tales como para los individuos con válvulas cardíacas mecánicas.

55 **[0012]** Las pruebas modificadas para evaluar con precisión la capacidad de coagulación de la sangre que podría superar las desventajas de los procedimientos actuales en la técnica, y hacer posible un ajuste de dosis más preciso y preferiblemente una monitorización menos frecuente de la actividad anticoagulante en pacientes anticoagulados, sería muy apreciada.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

60 **[0013]** La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de monitorización de la terapia anticoagulante y kits para el uso del procedimiento. Se basa en los experimentos de los inventores que indican que la medición de solamente la actividad de los factores II y X (FII y FX) refleja con mayor precisión la capacidad de coagulación que los actuales procedimientos convencionales (PT, P & P) y, por lo tanto, probablemente que el efecto antitrombótico de los anticoagulantes AVK en pacientes está mejor indicado por el nuevo procedimiento de prueba. La presente invención se basa en la determinación de la actividad combinada de sólo los factores de coagulación II y X y la
65 exclusión de la influencia de todos los otros factores de coagulación en los resultados de la prueba. El procedimiento implica mezclar plasma de prueba de un ser humano a ensayar con plasma deficiente en dos y únicamente factores

de coagulación II y X, pero con niveles normales de otros factores (en lo sucesivo denominado plasma deficiente en Fiix), a fin de corregir cualquier posible deficiencia en factores de coagulación distintos de FII y FX en la muestra de prueba, que de otro modo podrían influir en el resultado de la prueba. Mediante la adición de un reactivo de coagulación y de calcio, se puede medir la generación de trombina o fibrina. De esta manera, la actividad de factores II y X y su actividad combinada se pueden evaluar con precisión sin un efecto de confusión de otras deficiencias de factores. De este modo, la presente invención proporciona una evaluación de la capacidad de coagulación de la sangre, que los inventores creen que con mayor precisión que los procedimientos actuales, refleja el efecto antitrombótico de los agentes anticoagulantes AVK administrados al sujeto que está siendo analizado.

5
10 **[0014]** La presente invención proporciona además kits que son adecuados para realizar el procedimiento de la presente invención, que comprenden un reactivo de coagulación y plasma deficiente en dos y únicamente los factores II y X.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **[0015]**
Figura 1: tiempo de protrombina Quick (PT, panel A) o tiempo de protrombina de Owren (P & P, panel B) en relación con la reducción selectiva en la actividad de factores dependientes de la vitamina K individuales.

20 Figura 2: Parámetros ROTEM en relación con el porcentaje de P & P en 65 muestras de pacientes sobre la anticoagulación estable con warfarina.

Figura 3: Parámetros ROTEM (CT, MaxVel, MCF) en relación con la reducción selectiva de la actividad de factores de coagulación dependientes de la vitamina K individuales en plasma pobre en plaquetas.

Figura 4: Desarrollo del tiempo de Fiix-protrombina; tiempos de coagulación obtenidos en plasmas de prueba con actividad de FX y FII combinada oscilando del 1,6% al 100%. Las curvas describen resultados obtenidos con diferentes condiciones experimentales, es decir, diferente proporción de plasma de prueba con respecto a plasma deficiente en Fiix, así como diferentes prediluciones del plasma de prueba. Los experimentos representativos muestran una proporción del plasma de prueba con respecto al plasma total (volumen de plasma de prueba +

volumen de plasma Fiix): ▼ 0,09 (1 + 10); ▼ 0,17 (1 + 5); ◆ 0,25 (1 + 3); ◊ 0,28 (1 + 2,5); ▼ 0,31 (1 + 2,2); ★ 0,40 (1 + 1,5).

30 Figura 5. Correlación de Fiix-INR con INR (PP-INR) en 38 muestras seleccionadas al azar de pacientes estables con warfarina.

Figura 6. Una secuencia de mediciones de FII, FVII y FX en un único individuo empezando con warfarina en relación con respecto a INR (PP-INR, curva de negro) y Fiix-INR (curva roja). Los tiempos de coagulación (INR) cambian en relación con los cambios en las concentraciones de los factores VKD.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 **[0016]** La presente invención implica un procedimiento nuevo y proporciona kits basados en el procedimiento, para determinar capacidad de coagulación de la sangre de muestras de plasma humano, en particular para medir la actividad de un fármaco anticoagulante en pacientes que toman estos fármacos. La influencia de otros factores de coagulación distintos de FII y FX se elimina mediante este procedimiento. El procedimiento puede mejorar, en particular, el tratamiento anticoagulante con cumarinas (antagonistas de la vitamina K, AVK), tales como la warfarina, que reducen la concentración de los factores de coagulación activos (gamma-carboxilados) II, VII, IX y X. El nuevo procedimiento también puede tener aplicación para monitorizar otros anticoagulantes que inhiben FII o FX o ambos.

45 **[0017]** El fundamento subyacente de la presente invención se basa en los resultados experimentales que sugieren que la inclusión de la influencia de FVII de coagulación en el tiempo de coagulación en pacientes tratados con AVK, tal como se hace en los pruebas basados en el tiempo de protrombina convencionales, PT (Quick) y P & P (Owren), para la determinación de la capacidad de coagulación de la sangre, puede provocar una fluctuación en los resultados del tiempo de coagulación determinado que puede ser terapéuticamente irrelevante. Tales resultados confusos de la prueba, posiblemente, pueden inducir a error al médico cuando se ajusta la dosis de estos medicamentos potencialmente peligrosos. Esta nueva hipótesis ha conducido a una nueva invención, que se basa en las siguientes consideraciones y resultados experimentales:

55 I. Durante la iniciación de la anticoagulación oral (OA) con AVK y después de los cambios de dosis, la concentración de cada uno de los factores de coagulación (F) gamma carboxilados dependientes de la vitamina K (VKD) fisiológicamente activos se ve afectada en un grado diferente y a una velocidad diferente debido a sus vidas medias significativamente diferentes, es decir, aproximadamente 3,5 horas para el FVII (proconvertina), 52 horas para FX (factor Stuart) y 72 horas para FII (protrombina) (Roberts, H.R., Escobar M.A., Other coagulation factor deficiencies, 3ª edición. Thrombosis and Hemorrhage, ed S.A.I. Loscalzo J. Vol 1. 2003, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 575-598.). En consecuencia, la concentración de FVII cambia más rápidamente que los otros factores y esto puede tener una influencia importante en los valores medidos de PT/P&P, incluso cuando FII y FX no han cambiado significativamente.

II. Algunos estudios anteriores han indicado que la influencia antitrombótica de FVII durante la terapia con cumarinas puede ser menos importante que la de la protrombina (FII) o FX (Zivelin et al, J Clin Invest, 1993. 92 (5): pág. 2131-40; Xi et al, Thromb Haemost, 1989. 62 (2): pág. 788-91). Xi et al. mostró que la actividad de protrombinasa (la generación de trombina) en muestras anticoaguladas de pacientes tratados con cumarinas era dependiente de la concentración de FX y, en particular, de la concentración de FII, pero menos dependiente de la actividad de FVII, lo que demostró una primera relación umbral evidente a concentraciones muy bajas de FVII. Zivelin et al. encontraron que el efecto antitrombótico de los factores VKD en conejos depende de la concentración de FX y en particular de la concentración de FII, pero no de la concentración de FVII. Además, se demostró en estudios clínicos, que la monitorización de AVK midiendo el antígeno de protrombina nativa (NPA) por ELISA parecía ser más predictivo de eventos adversos que la monitorización con la PT, lo que sugiere una cierta inexactitud de las mediciones de PT (Furie et al., Blood, 1984. 64 (2): pág. 445-51; Furie et al, Blood, 1990. 75 (2): pág. 344-9; Kornberg et al, Circulation, 1993. 88 (2): pág. 454-60). Finalmente, el estudio de Brummel et al. usando plasma anticoagulado de pacientes tratados con warfarina demostró que existía una escasa relación entre los tiempos de coagulación basados en PT (INR) y la generación de trombina en respuesta a factor tisular diluido (Brummel et al, Circulation, 2001, 104 (19): pág. 2311-7). Estos hallazgos utilizando tromboelastometría de rotación (ROTEM) y factor tisular diluido confirman esta observación, indicando la inexactitud de los procedimientos de monitorización basados en PT o P & P.

[0018] El término "plasma de prueba" o "muestra de plasma de prueba" se refiere en este contexto a plasma de un paciente o sujeto para el cual se desea una prueba de coagulación de la sangre.

[0019] "Plasma normal" se refiere a plasma adecuado para uso como control, de individuos sanos normales, preferentemente y típicamente agrupados a partir de varios individuos para normalizar cualquier variación inter-individual en la concentración de los factores pertinentes.

[0020] "Reactivo de coagulación" se refiere a un reactivo que activa la vía de coagulación en una muestra de sangre o plasma, que conduce a la conversión de protrombina en trombina y fibrinógeno en fibrina.

[0021] El procedimiento de la invención se basa en la medición de la actividad combinada de dos y únicamente los factores de coagulación II y X, lo que significa que el efecto de otros factores que puede ser variable en la muestra de prueba (por ejemplo, FI, FV, FVII y FIX) es eliminado. "Actividad combinada" en el presente documento se refiere a efectos medidos debido a la actividad tanto de FII como de FX, pero el efecto de uno no se diferencia del otro.

[0022] En el procedimiento de la invención, la muestra de plasma de prueba se mezcla con plasma deficiente en Fiix, como se menciona anteriormente, la proporción del plasma de prueba con respecto al plasma deficiente está en el intervalo de 1:1 a 1:20, preferiblemente en el intervalo de 1:4 a 1:10, tal como en el intervalo de 1:5 a 1:8, tal como, pero no limitado a 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o 1:10. Tal como se usa en el presente documento, la notación 1:4 significa una parte de plasma de prueba contra cuatro partes de plasma deficiente, es decir cinco partes de plasma en total (es decir, 20% de plasma de prueba y 80% de plasma deficiente).

[0023] Generalmente, la muestra de prueba de plasma se trata como para las pruebas de coagulación convencionales, es decir, una muestra de sangre fresca extraída del paciente es tratada con citrato para el agotamiento del calcio, y los glóbulos rojos de la sangre se separan del plasma por centrifugación. La muestra de plasma de prueba preparada se puede entonces convenientemente mezclarse con plasma deficiente en Fiix, adecuadamente justo antes del análisis.

[0024] Se añade un reactivo de coagulación al plasma de prueba, y calcio, para desencadenar la coagulación. El reactivo de coagulación y el calcio pueden premezclarse entre sí o cada uno se añade por separado a la muestra de plasma de prueba. Alternativamente, cualquiera o ambos reactivos pueden premezclarse con el plasma deficiente. Por consiguiente, las etapas del procedimiento reivindicado que implican la mezcla de muestra de plasma de prueba con plasma deficiente y la adición del reactivo de coagulación y el calcio pueden llevarse a cabo en una, dos o tres etapas.

[0025] El reactivo de coagulación puede ser cualquiera de los reactivos usados comúnmente en pruebas convencionales como los descritos anteriormente, tales como, pero no limitado a, tromboplastina (incluyendo factor tisular recombinante), fosfolípidos, el factor IXa, el factor XIa, el factor XIIa, calicreína, el factor VIIa, el factor VIIIa y activador exógeno, tal como el veneno de serpiente que activa el factor X.

[0026] El presente procedimiento funciona con la activación de la coagulación a través de la vía intrínseca o la vía extrínseca. Los reactivos de coagulación tromboplastina y el factor VIIa activarán la vía extrínseca, mientras que los siguientes reactivos de coagulación activan la vía intrínseca: fosfolípidos, el factor IXa, el factor XIa, el factor XIIa, calicreína, o el complejo de factores IXa/VIIIa.

[0027] Los activadores exógenos, tales como venenos de serpiente, se pueden utilizar en el procedimiento de la invención. Éstos incluyen veneno de víbora de Russel (veneno de serpiente de *Daboii russelii*) que puede obtenerse de una fuente natural o producirse recombinantemente. También se pueden usar otros venenos de serpiente que activan el factor X directamente a través de la vía común.

[0028] La tromboplastina no es una proteína pura, sino un complejo de proteínas del factor tisular y fosfolípidos. El factor tisular (también conocido como factor tisular de plaquetas, factor III, tromboquinasa o CD142) es una proteína transmembrana integral que es un receptor de superficie celular para el factor VIIa, que funciona como un cofactor obligatorio para la actividad proteolítica del factor VIIa hacia el factor X que convierte el factor X en el factor de proteasa activa Xa. El factor tisular necesita asociarse con fosfolípidos coagulantes para la expresión completa de su función cofactor.

[0029] La tromboplastina utilizada en el procedimiento y kits de la invención se puede obtener de fuentes animales como son conocidas para el experto, incluyendo, pero no limitado a, cerebro de conejo, placenta humana, cerebro humano, cerebro bovino, pulmón bovino, u otras fuentes adecuadas. La tromboplastina también puede ser tromboplastina producida de forma recombinante que es preferiblemente tromboplastina humana recombinante. La tromboplastina recombinante se puede producir mediante la expresión del componente de factor tisular en cultivo celular adecuado, por ejemplo de cultivo de células de ratón de la placenta, células de ovario de hámster (células CHO); células de hongos, organismos procariontas, por ejemplo, en cultivos de *E. coli*; plantas transgénicas u otro vehículo de expresión adecuado, y, posteriormente, el factor tisular se lipida *in vitro*.

[0030] En algunas realizaciones de la invención, el reactivo de coagulación comprende fosfolípidos, éstos pueden derivarse de varias fuentes naturales o sintetizarse y/o modificarse químicamente. Los fosfolípidos utilizados en las pruebas de coagulación también se denominan como tromboplastina parcial, aunque habitualmente la tromboplastina parcial se refiere a extractos de fosfolípidos separados de diversos tejidos. Cuando se utilizan fosfolípidos como reactivo de coagulación, éstos pueden ser, preferentemente, de una composición adecuada, enriquecida en fosfolípidos que tienen una buena actividad procoagulante, tal como, pero no limitado a, fosfatidil serina. El reactivo de coagulación puede, en ciertas realizaciones, utilizarse con un activador, en particular, cuando los fosfolípidos se utilizan como reactivo de coagulación. Dicho activador puede seleccionarse adecuadamente a partir de, pero no está limitado a, partículas de caolín, celite, partículas de vidrio, partículas de sílice, que pueden o no ser sílice micronizada, o ácido elálgico. En esta realización, el procedimiento corresponde a lo que se conoce como la prueba APTT (tiempo de tromboplastina parcial activada), excepto que, de acuerdo con la invención, se añade plasma deficiente en Fiix, haciendo que los resultados de la prueba Fiix-APTT sólo reflejen la actividad de FII y/o FX. Cuando se utilizan fosfolípidos sin activador como reactivo de prueba, la prueba se puede comparar con lo que se conoce como la prueba de PTT, es decir, Fiix-PTT.

[0031] Las combinaciones de más de un reactivo de coagulación se utilizan en ciertas realizaciones, tales combinaciones incluyen el uso de tromboplastina y factor VIIa, y una combinación de los factores IXa y VIIIa.

[0032] La fuente de calcio es generalmente, pero no necesariamente cloruro de calcio.

[0033] La cantidad/concentración de reactivo de coagulación en el procedimiento es generalmente similar a la de los procedimientos actuales para medir la coagulación. Cuando se utiliza tromboplastina, los resultados pueden normalizarse basándose en el valor de ISI, realizado adecuadamente como en la normalización de las pruebas PT Quick y PT Owen.

[0034] El reactivo de coagulación y/o plasma deficiente preferiblemente se liofilizan y en tal caso se reconstituyen antes de su uso en agua o tampón adecuado.

[0035] El calcio se utiliza en la concentración convencional, tal como en el intervalo 1,0-4,0 mM, preferiblemente 2,5 mM.

Determinación del punto final:

[0036] La determinación del punto final en el procedimiento de la invención puede ser de cualquier tipo utilizado actualmente de forma convencional, incluyendo, pero no limitado a, la determinación manual (visual) mediante la técnica de inclinación del tubo, la detección mecánica usando procedimientos de detección de coágulos, tales como "bola rodante" o técnica de sonda vibrante (detectando cuando la sonda es estática debido a la mayor viscosidad), procedimientos de detección óptica utilizando detección óptica de la formación de fibrina, y también técnicas cromogénicas basadas en el uso de sustratos cromogénicos, incluyendo sustratos para la trombina (por ejemplo sustrato S2238 (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA, Milán, Italia) y sustratos para FXa, tales como BIOPHEN CS-11 (22) (Aniara, Mason OH, EE.UU.).

[0037] Otras realizaciones incluyen el uso de sustratos fluorogénicos, que tras la escisión por una enzima amidolítica (por ejemplo, trombina, o factor Xa) liberan un marcador fluorogénico. Éstos incluyen, pero no se limitan, a péptido-amidas de 4-metil-cumarina (MCA), por ejemplo Peflafluor FXa (PEFA-5534) (Pentapharm Ltd. Basilea, Suiza) que es un sustrato sensible para el factor Xa. En otras realizaciones, se utilizan sustratos luminógenos, éstos incluyen el sustrato S-2613 (t-butiloxicarbonil-isoleucil-glutamil-gamma-piperidil-glicil-arginil-isoluminol), para otros sustratos, véase, por ejemplo Hemker HC, Handbook of synthetic substrates for the coagulation and fibrinolytic system, Martinus Nijhoff Publishers, Boston (1983).

Kits de la invención:

5 **[0038]** En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que son adecuados para el funcionamiento del procedimiento de la invención en los laboratorios clínicos de todo el mundo. Por consiguiente, los kits están configurados para proporcionar en recipientes con una cantidad adecuada y listos para el uso los reactivos necesarios para la ejecución de pruebas de acuerdo con la invención. El kit de prueba de la presente invención comprende un reactivo de coagulación, tal como uno o más de los anteriores mencionados en la descripción de los procedimientos de la invención, y plasma normal que es deficiente sólo en el factor II y el factor X (plasma deficiente en FiiX).

15 **[0039]** El plasma deficiente es plasma que es deficiente sólo en el factor II y el factor X, de tal manera que todavía contiene otros factores de coagulación, tales como el factor VII y el factor IX. El plasma deficiente se produce adecuadamente como se ha descrito anteriormente, es decir, plasma normal como se define anteriormente que se hace deficiente en FII y FX, preferiblemente con procedimientos de inmunogotamiento.

20 **[0040]** En algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden además una fuente de iones de calcio, que puede ser proporcionada en su propio contenedor designado o incluirse con el reactivo de coagulación o el plasma deficiente. En otras realizaciones, el calcio no se proporciona como parte del kit, ya que muchos laboratorios y aparatos de coagulación tienen fuentes adecuadas de reactivo de calcio.

25 **[0041]** El reactivo de coagulación y dicho plasma deficiente pueden proporcionarse en ciertas realizaciones ser proporcionado en un único recipiente, que además se puede proporcionar con o sin iones de calcio. En otras realizaciones, el reactivo de coagulación y el plasma deficiente se proporcionan en recipientes separados.

30 **[0042]** El reactivo de coagulación y el plasma deficiente se proporcionan preferiblemente en forma de polvo liofilizado, ya sea o no proporcionados separados o combinados en el mismo vial. Dicho uno o más recipientes se configuran adecuadamente de manera que el material liofilizado puede ser reconstituido en el recipiente original.

30 EJEMPLOS - PARTE EXPERIMENTAL

35 **[0043]** Los inventores estaban interesados en estudiar la contribución de cada factor de coagulación VKD sobre la coagulación, medido por tromboelastometría de rotación (ROTEM). Los resultados de estos experimentos llevó a creer que la influencia de la FII y FX llevaba sustancialmente más peso en la formación de coágulos que FVII y FX a concentraciones clínicamente relevantes de estos factores. Sin embargo, no se pudo discernir la diferencia entre el efecto de FII y FX. Esta observación dio lugar a la presente invención, tal como se describe a continuación.

40 **[0044]** No se tenía conocimiento de un estudio previo usando ROTEM activado con tromboplastina altamente diluida para evaluar sistemáticamente la contribución de cada uno de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K en la formación de coágulos. ROTEM es una prueba de coagulación global realizada habitualmente en sangre entera. El procedimiento ROTEM, además de medir el tiempo de iniciación de la polimerización de la fibrina, es decir, el tiempo de coagulación (ROTEM CT, fase de iniciación) también mide los aspectos consiguientes de la coagulación (Rand et al, Blood, 1996. 88 (9): pág. 3432-45), incluyendo la velocidad de la fase de propagación posterior de la formación del coágulo mayor (medida como ángulo alfa o velocidad máxima ROTEM, "MaxVel") y, finalmente, la máxima firmeza del coágulo (MCF), que refleja la fase de estabilización final (Sorensen et al., J Thromb Haemost, 2003. 1 (3): pág 551-8). Los resultados ROTEM realizados sobre sangre entera son una función no sólo de factores de coagulación, sino también de la función plaquetaria, proteasas, inhibidores y el sistema fibrinolítico. ROTEM, en opinión de algunos investigadores, describe mejor la formación de coágulos que las pruebas de coagulación tradicionales realizadas sobre PPP, ya que las pruebas de coagulación tradicionales sólo miden la fase de iniciación (Ganter et al, J Cardiothorac Vasc Anesth, 2008. 22 (5): pág. 675 -80). Dado que no se pudieron realizar experimentos sobre la sangre entera se compararon experimentos realizados sobre PPP con experimentos con fosfolípido de plaquetas añadidos o plaquetas de bancos de sangre. La mayoría de los resultados fueron similares, a menos que se indique lo contrario. En nuestros experimentos ROTEM se utilizó una tromboplastina altamente diluida (1:17.000) (Brummel et al, supra) que puede reflejar más estrechamente la concentración fisiológica del factor tisular que la alta concentración de tromboplastina utilizada en las pruebas de TP.

Reactivos y las condiciones experimentales:

60 Preparación de plasma y plaquetas

65 **[0045]** Se extrajo sangre de los pacientes en tratamiento con anticoagulación con warfarina para la fabricación de muestras de prueba de PPP. La sangre también se extrajo de veinte donantes sanos (10 hombres, 10 mujeres) para producir plasma normal mezclado (PNP), para las pruebas de coagulación y análisis ROTEM. Usando una técnica de mínimo estasis, se extrajo sangre a través de una aguja 21G en tubos Vacuette® de citrato de sodio tamponado al 1/10 vol/vol 3,2% (0,109 mol/l) (Greiner, Kremsmünster, Austria). El plasma pobre en plaquetas (PPP) se preparó por centrifugación de la sangre a 4°C durante 15 minutos a 2500 g, la eliminación del sobrenadante y nueva

centrifugación durante 15 minutos a 2500 g. El PNP se preparó combinando el plasma normal recentrifugado y el material final se almacenó en alícuotas de 0,5 ml a -80°C. Los plasmas con déficit de factores inmunoagotados se obtuvieron de Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, Vermont, EE.UU.). Los plasmas inmunoagotados se agotaron selectivamente en los factores de coagulación II, VII, IX o X y no hubo actividad inhibidora residual en los plasmas.

[0046] Se produjeron plaquetas congeladas-descongeladas (ráfaga) (fosfolípidos de las plaquetas) y plaquetas lavadas a partir de un concentrado de plaquetas de un banco de sangre donado recientemente en dextrosa, ácido y citrato (ACD). Para ambas, las plaquetas se lavaron de la siguiente manera: el plasma rico en plaquetas (PRP) se centrifugó durante 15 minutos a 2500 g y a continuación se resuspendieron 1:1 vol/vol en tampón TBS (6,055 g de base Trizma (Sigma, Seetze, Alemania), 8,766 g de NaCl, pH 7,4, 1000 ml H₂O). Después de la resuspensión, los tubos se llenaron con tampón TBS y se volvieron a centrifugar durante 10 min a 2500 g. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió dos veces. La suspensión final se contó automáticamente usando Sysmex 4000 (Sysmex Corp., Kobe, Japón) y la solución final se ajustó a un recuento de plaquetas de 100x10⁹/l. La solución final fue congelada a -80°C, se descongeló de nuevo y a continuación se volvieron a tomar alícuotas en tubos pequeños y se congelaron de nuevo para producir fosfolípidos plaquetarios, o alternativamente, las plaquetas lavadas se almacenaron a temperatura ambiente y se utilizaron en dos días.

Reactivos

[0047] Los plasmas con déficit de factores utilizados para analizar los factores de coagulación se obtuvieron de Diagnostica Stago (Asnieres, Francia). El tampón Hepes (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, con y sin CaCl₂ 200 mM, pH 7,4) se obtuvo de Bie y Berntsen Inc. (Herlev, Dinamarca). La tromboplastina recombinante (TF) (Innovin®) se obtuvo de Dade Behring (Marburg, Alemania). Innovin se reconstituyó y se almacenó en alícuotas de 100 µl a 80°C en tubos Eppendorf. Un tubo de Innovin se reconstituyó para cada experimento y se mezclaron 10 µl de Innovin en 990 µl de Hepes CaCl₂ para producir una dilución 1:100 que se diluyó aún más mediante la mezcla de 100 µl de la dilución 1:100 con 500 µl de Hepes CaCl₂ para producir una solución de trabajo 1:600.

[0048] El PPP inmunoagotado de los factores de coagulación FII o FVII o FIX o FX o de FII y FX se obtuvieron de Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, Vermont, EE.UU.). El plasma agotado se mezcló en plasma normal combinado en diferentes proporciones tal como se describe con cada experimento a continuación. Se añadió tromboplastina y calcio y se midieron los tiempos de coagulación en diluciones progresivamente crecientes de plasma normal con tampón de Owren.

Experimentos ROTEM

[0049] Los perfiles de formación dinámica de coágulos de sangre fueron registrados por un Analizador de Coagulación por Tromboelastometría ROTEM (Pentapharm, Munich, Alemania) tal como se describe en detalle en otras partes [Sorensen, B., et al, J Thromb Haemost, 2003. 1 (3): pág. 551-8. Ingerslev, J., et al. Haemophilia, 2003. 9 (4): pág. 348-52. Fenger-Eriksen, C., et al. Br J Anaesth, 2005. 94 (3): pág. 324-9], pero difiere en que en vez de sangre entera, se utilizó PPP citrado. En resumen, la mezcla de reacción contenía 270 µl de plasma citrado + 30 µl de tampón + 20 µl de TF diluido y CaCl₂. Todos los resultados mostrados son las medias de cuatro experimentos. La medición por tromboelastometría (ROTEM) se basó en la activación de la coagulación con tromboplastina altamente diluida (dilución final de la mezcla de reacción de TF 1:17.000). La evaluación de la formación de coágulos de plasma se basó en parámetros de tromboelastometría estándar, tales como el tiempo de coagulación (TC), la velocidad máxima (MaxVel) y la firmeza máxima del coágulo (MCF). El CT caracteriza la fase de iniciación de la formación de coágulos. La MaxVel representa la fase de propagación de la coagulación y la MCF indica la fase de estabilización. 9999

[0050] Los experimentos ROTEM se realizaron en diluciones de PNP realizadas con el plasma con déficit de factores pertinentes (FII, FVII, FIX o FX) mezclado gradualmente con el aumento de la proporción de plasma normal con el fin de producir concentraciones finales de los factores de coagulación de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 50%. Las mezclas se diluyeron 1:600 en dos etapas con tampón HEPES CaCl₂. Los experimentos se realizaron sin y con fosfolípido de plaquetas añadido o plaquetas del banco de sangre lavadas. Las cubetas experimentales se montaron en un soporte de copa de aluminio que fue controlado termostáticamente a 37°C. La mezcla de 270 µl de cada dilución de plasma y 30 µl de plaquetas lavadas se colocaron en las copas de medición. La medición se inició mediante la adición de 20 µl de la dilución 1:600 de TF recombinante y la colocación de la copa en un pin de 6 mm de diámetro que está unido al extremo inferior de un eje vertical. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

Tiempo de protrombina

[0051] Tanto el tiempo de protrombina Quick (PT) como el tiempo de protrombina de Owren (tiempo de proconversión de protrombina, prueba P & P) se midieron en muestras de pacientes. Se utilizó el analizador de coagulación STA-R (Diagnostika Stago, Asnieres, Francia). El PT se realizó utilizando STA-Néoplastine® CI plus como reactivo de coagulación, con un valor de ISI de 1,3 y el P & P se realizó utilizando el reactivo STA-SPA 50 con

ISI de 1,01 (ambos de Diagnostika Stago). El reactivo de P & P es similar al reactivo de PT, pero también consiste en plasma bovino absorbido añadido como fuente del factor V de coagulación y fibrinógeno y, por tanto, sólo es sensible a la actividad de FII, FVII y FX. Los porcentajes de P & P se calcularon a partir de una curva estándar basándose en plasma combinado diluido en serie en tampón de Owren. La INR se calcula tal como se describe anteriormente.

Análisis estadístico

[0052] Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc. CA, EE.UU.) para la representación gráfica y cálculos estadísticos, incluyendo y análisis de regresión lineal y no lineal. Todos los datos se muestran como media \pm 1 error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

Ejemplo 1: PT y P & P en relación con la reducción selectiva de los factores VKD individuales.

[0053] La relación entre PT y la concentración reducida de los factores de coagulación VKD seleccionados FII, FVII, FIX o FX en PPP se muestra en la Figura 1. El tiempo de protrombina Quick se muestra en el panel A y el tiempo de protrombina de Owren (P & P) en el panel B. Los experimentos se realizaron mediante el agotamiento gradual de plasma completamente inmunoagotado de un solo factor mediante la mezcla gradual en plasma normal. Tal como se esperaba, ambos tipos de mediciones de PT (Quick y Owren) eran igualmente sensibles a la concentración de FII, FVII y FX a lo largo de las concentraciones probadas, mientras que ninguna medición fue sensible a la actividad de FIX.

Ejemplo 2: Correlación de parámetros ROTEM con PT de Owren en muestras de pacientes tratados con warfarina

[0054] Se compararon los parámetros de ROTEM y los resultados de pruebas de P & P en muestras de PPP obtenidas de 65 pacientes consecutivos tratados con warfarina que asistieron a la clínica de anticoagulación (Figura 2). Sólo hubo una correlación moderada entre la actividad coagulante en porcentaje de la prueba P & P y el CT de ROTEM ($R^2 = 0,27$, $p < 0,0001$) con una marcada variación en el CT de ROTEM en un porcentaje similar de P & P. Hubo una mala correlación entre la MaxVel de P & P y ROTEM ($R^2 = 0,08$, $p < 0,0001$) y la MCF de ROTEM ($R^2 = 0,11$, $p = 0,0014$). Se observan resultados similares si la INR se representa frente a los parámetros de ROTEM (no mostrados). Los parámetros de ROTEM también se midieron en PPP adsorbido igualmente agotado de todos los factores VKD. Mediante la mezcla en concentraciones progresivamente aumentadas de PPP normal combinado, el plasma adsorbido se agotó gradualmente con concentraciones iguales de factores VKD. Con todas las concentraciones de factores VKD igualmente reducidas, se encontró una buena correlación, es decir, R^2 por regresión no lineal fue de 0,79 para el CT de ROTEM, 0,64 para la MaxVel de ROTEM y 0,77 para la MCF de ROTEM (curvas no mostradas).

Ejemplo 3: Parámetros de ROTEM en relación con la reducción selectiva de factores VKD individuales

[0055] Con el fin de evaluar por separado la influencia de cada factor VKD en parámetros de ROTEM, se ha probado la coagulación con ROTEM en PPP selectivamente inmunoagotado en un solo factor VKD individual y a continuación se agotó gradualmente en el factor deficiente relevante mediante la mezcla en el plasma normal. Los datos mostrados en la figura 3 se refieren a experimentos en PPP sin fosfolípido de plaquetas añadido o plaquetas lavadas. El CT de ROTEM (fase de iniciación) (Figura 3A) se prolongó marcadamente más mediante la reducción selectiva gradual en FII o FX a niveles leves y moderadamente bajos (similares a los deseados durante la anticoagulación) que mediante reducciones similares en FVII o FIX. Los resultados fueron similares en PPP con fosfolípido de plaquetas añadido y en PPP con plaquetas lavadas añadidas (datos no mostrados). La MaxVel de ROTEM (Figura 3B) que representa la fase de propagación de la formación de coágulos de ROTEM también fue más dependiente de la concentración de FII y FX que de la concentración de FVII o FIX en PPP y también en PPP enriquecido con fosfolípidos de plaquetas (datos no mostrados), pero posiblemente más dependiente de la concentración de II que de la concentración de X con plaquetas lavadas añadidas (datos no mostrados). Por último, la fase de estabilización o MCF de ROTEM en PPP (Figura 3C) fue más dependiente de FII y FX que de FIX o FVII.

[0056] En base a estos experimentos de ROTEM, se concluyó que FII o FX tienen más peso en la formación de fibrina que los factores de FVII y FIX a concentraciones de factor reducidas levemente y moderadamente, similares a las presentes y deseadas durante la terapia con cumarina. FII y FX tenían más influencia en todas las fases de la formación de coágulos (iniciación, propagación y estabilización) que FVII y FIX. La mala correlación de los parámetros de ROTEM con el PT de Owren (INR) descrita anteriormente en muestras de plasma de pacientes posiblemente refleja esta discrepancia entre FVII por un lado y FII y FX por otro en la formación de coágulos en pruebas de PT y ROTEM.

[0057] También se concluyó que el efecto combinado de FII y FX puede tener considerablemente más peso en la formación de coágulos que FVII o FIX a concentraciones de factores relevantes para la terapia anticoagulante. Sin embargo, dado que FVII tiene una vida media mucho más corta que FII y FX, las fluctuaciones en los tiempos de

protrombina (PT o P & P) puede estar a veces relacionada principalmente con el cambio de concentración de FVII y no puede predecir un verdadero cambio en la potencial formación de coágulos o en el efecto antitrombótico. El efecto confuso de FVII que causa la fluctuación de PT podría conducir potencialmente a la dosificación errónea de AVK y pruebas de monitorización innecesariamente frecuentes. Por lo tanto, la inclusión de sensibilidad a FVII en las pruebas de monitorización actuales, posiblemente puede reducir la eficacia y la seguridad y aumentar el costo de la terapia con cumarinas. Se contempla que la fluctuación en el efecto anticoagulante de AVK podría reducirse mediante la eliminación de la influencia de FVII en las pruebas de monitorización.

Ejemplo 4: Procedimiento de Fiix aplicado en plasma de muestra

Prueba basada en el procedimiento de Fiix

[0058] La presente invención se basa en la idea de que mediante la mezcla de una muestra de plasma a analizar con plasma que es deficiente (totalmente agotado) en los factores FII y FX (aquí referido como plasma deficiente en Fiix), corrigiendo así todas las demás deficiencias de factores de coagulación posibles en la muestra, y posteriormente midiendo el tiempo de coagulación después de la activación de la coagulación con un reactivo de coagulación, los resultados de la prueba sólo reflejarán la actividad de la coagulación de FII y FX.

[0059] Los resultados de la prueba se pueden obtener como tiempo de coagulación, la relación del tiempo de coagulación o cualquier otro punto final que mide la generación de trombina o la formación de fibrina. Los resultados experimentales mostrados en los ejemplos del presente documento se basan en la medición de los tiempos de coagulación con tromboplastina (STA® - Neoplastine® CI plus de Diagnostica Stago) como reactivo de coagulación en el instrumento STA-R (Diagnostica Stago). Dado que ésta es una variante del tiempo de protrombina, se le denomina "tiempo de protrombina de Fiix" o PT de Fiix.

[0060] En el nuevo procedimiento, que se le denomina procedimiento de Fiix, se mezcla una muestra de plasma de prueba (el plasma del paciente) se mezcla con plasma normal que ha sido immunoagotado en FII y FX (plasma deficiente en Fiix). Utilizando dicha mezcla, mediante la adición de tromboplastina y calcio, se puede medir una variante del tiempo de protrombina que sólo es sensible a FII y FX, es decir PT de Fiix. En el PT de Fiix, las proporciones de plasma de prueba con respecto a plasma deficiente en Fiix pueden estar en el intervalo de 1:1 a 1:20 partes, preferiblemente en el intervalo de 1:2 a 1:10 (ver a continuación).

[0061] Los resultados demostrativos de los experimentos de los presentes inventores utilizando tromboplastina como reactivo de coagulación (es decir PT de Fiix) se muestran en la figura 4. Los resultados muestran los tiempos de coagulación obtenidos en relación con el "porcentaje de Fiix", es decir, la concentración en porcentaje de FII y FX combinados. Las diferentes curvas representan diferentes diluciones de plasma normal, así como diferentes relaciones de plasma muestra normal con respecto a plasma deficiente en Fiix en la mezcla.

[0062] La relación de plasma de prueba y el plasma deficiente en Fiix en las muestras mostradas en la figura 4 es la siguiente: ▽ 0,09 (1 + 10); ▽ 0,17 (1 + 5); ◆ 0,25 (1 + 3); ◊ 0,28 (1 + 2,5); ▼ 0,31 (1 + 2,2); ★ 0,40 (1 + 1,5).

[0063] Se utilizaron diferentes relaciones, pero el objetivo era ser capaz de medir de forma fiable concentraciones de FII y FX < 2 u/dl (u se refiere a unidades equivalentes de plasma). Con el fin de medir con precisión concentraciones de FII y FX tan bajas como < 2 u/dl, los resultados experimentales sugieren que una relación preferible de plasma de prueba con respecto al plasma deficiente en Fiix está en el intervalo de 1:2-1:10.

[0064] En base de los experimentos mostrados en la figura 4 se decidió medir el PT de Fiix mediante la mezcla de 80 µl de una dilución 1:7 de plasma de prueba con 25 µl de plasma deficiente en Fiix (es decir, proporción final de 1 parte de plasma de prueba a 2,2 partes de plasma deficiente en Fiix). A continuación, se midió el "PT de Fiix" en muestras de 38 pacientes en tratamiento estable con warfarina y se calculó la relación normalizada internacional ("INR de Fiix" o "Fiix-INR"). Tal como se muestra en la figura 5, la INR de Fiix se correlaciona bien con los valores de INR basados en PT de Owren (INR de PP; R² = 0,87, p <0,0001). Los resultados correspondientes se encontraron cuando INR de Fiix se correlacionó con INR basado en PT Quick (INR de PT, datos no mostrados).

[0065] En la figura 6, se muestran mediciones secuenciales de INR de Fiix, INR de PP, FII, FVII y FX durante 49 días en un único paciente empezando con warfarina. La cantidad de factores de coagulación (porcentaje) se muestra en el eje Y izquierdo y el valor de INR en el eje Y derecho. El cambio en la INR en relación con cambios en las concentraciones de los factores VKD se puede derivar de la gráfica. En resumen, la INR de PT muestra más que la fluctuación que la INR de Fiix, siendo la razón que la INR de PT responde a los rápidos cambios que se producen en FVII, pero la INR de Fiix no. Sin embargo, dado que, en base a los experimentos previamente discutidos y la hipótesis basados en los mismos, de que la concentración de FII y FX es el principal responsable del efecto antitrombótico de la warfarina, se presenta que la INR de Fiix describe con más precisión el efecto antitrombótico presente en el paciente.

[0066] En particular, se puede observar que el valor de INR de PT se eleva mucho más rápido que la INR de Fiix los

5 primeros días de la administración, esto se puede atribuir a la reducción rápida de FVII, lo que tiene un efecto en el valor de INR de PT medido, pero no en el valor de INR de Fiix. El valor INR de PT indica que ya en el día 3, el paciente ha alcanzado un rango anticoagulado aceptable (zona gris) y la inmersión después del día 4 indica que la dosis de warfarina probablemente se ha reducido. La curva de Fiix, por otro lado, indicó que el paciente alcanza un valor de INR aceptable (anticoagulación aceptable) en el día 5. El valor de Fiix permanece en la zona de INR adecuada en los siguientes días 6 y 7, mientras que los valores de INR de PT erróneamente indican que el paciente está recibiendo una dosis demasiado alta de warfarina.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para medir la actividad de un fármaco anticoagulante antagonista de la vitamina K en un paciente, que se basa en la medición en una muestra de plasma de prueba de dicho paciente de la actividad combinada de dos y únicamente los factores de coagulación II y X, comprendiendo el procedimiento:
- 5 - mezclar dicha muestra de plasma de prueba con plasma deficiente sólo en el factor II y el factor X, en el que la proporción de dicha muestra de plasma de prueba y dicho plasma deficiente está en el intervalo de 1:1 a 1:20,
 - añadir a dicha muestra de plasma de prueba uno o más reactivos de coagulación y calcio, y
 - determinar la capacidad de coagulación de la sangre mediante la medición del tiempo de coagulación de la sangre o la generación de trombina.
- 10
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho uno o más reactivos de coagulación se seleccionan del grupo que consiste en:
- 15 i) tromboplastina,
 ii) fosfolípidos,
 iii) factor IXa,
 iv) factor XIa,
 v) factor XIIa,
 vi) calicreína,
 20 vii) activador exógeno, incluyendo venenos de serpiente que activan el factor X, y
 viii) factor VIIa
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, que comprende añadir un activador de contacto seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 i) partículas de caolín,
 ii) celite,
 iii) partículas de vidrio,
 iv) partículas de sílice, y
 v) ácido elágico.
- 30
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de diluir dicha muestra de plasma de prueba con tampón o solución salina.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho reactivo de coagulación se diluye con agua, una solución acuosa salina o una solución acuosa tamponada.
- 35
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos un componente de dicho reactivo de coagulación, plasma deficiente o fuente de calcio está liofilizado, y en el que el procedimiento comprende además una etapa de reconstitución de dicho al menos un componente.
- 40
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de determinar la capacidad de coagulación de la sangre comprende un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en:
- 45 - detección manual/visual de la coagulación,
 - procedimientos mecánicos y/o electrónicos para observar cambios de viscosidad,
 - procedimientos ópticos de detección de la formación de coágulos,
 - detección cromogénica utilizando sustratos cromogénicos,
 - detección fluorogénica utilizando sustratos fluorogénicos, y
 - detección luminogénica.
- 50
8. Kit de prueba para medir la actividad de un fármaco anticoagulante antagonista de la vitamina K en un paciente, que comprende:
- 55 - un reactivo de coagulación, y
 - plasma normal que es deficiente sólo en el factor II y el factor X y que contiene otros factores, que incluyen el factor VII y IX (plasma deficiente en Fiix), y
 - opcionalmente, que comprende una fuente de iones de calcio.
9. Kit de prueba, según la reivindicación 8, que comprende en un recipiente dicho reactivo de coagulación y dicho plasma deficiente en Fiix.
- 60
10. Kit de prueba, según la reivindicación 8 ó 9, que comprende un primer recipiente que comprende dicho reactivo de coagulación y dicho plasma deficiente en Fiix.
11. Kit de prueba, según la reivindicación 8, que comprende en un primer recipiente dicho reactivo de coagulación y en un segundo recipiente dicho plasma deficiente en Fiix.
- 65
12. Kit de prueba, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho reactivo de coagulación se

selecciona entre uno o más de:

- i) tromboplastina,
 - ii) fosfolípidos,
 - iii) factor IXa,
 - 5 iv) factor XIa,
 - v) factor XIIa,
 - vi) caliceína,
 - vii) activador exógeno, incluyendo venenos de serpiente que activan el factor X, y
 - viii) factor VIIa
- 10 13. Kit de prueba, según la reivindicación 12, en el que dicho reactivo de coagulación comprende fosfolípidos, en el que el kit comprende en un recipiente dicho reactivo de coagulación, un activador de contacto, tal como se describe en la reivindicación 4, y plasma deficiente en Fiix.
- 15 14. Kit de prueba, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que dicho reactivo de coagulación y/o dicho plasma deficiente en Fiix están liofilizados.

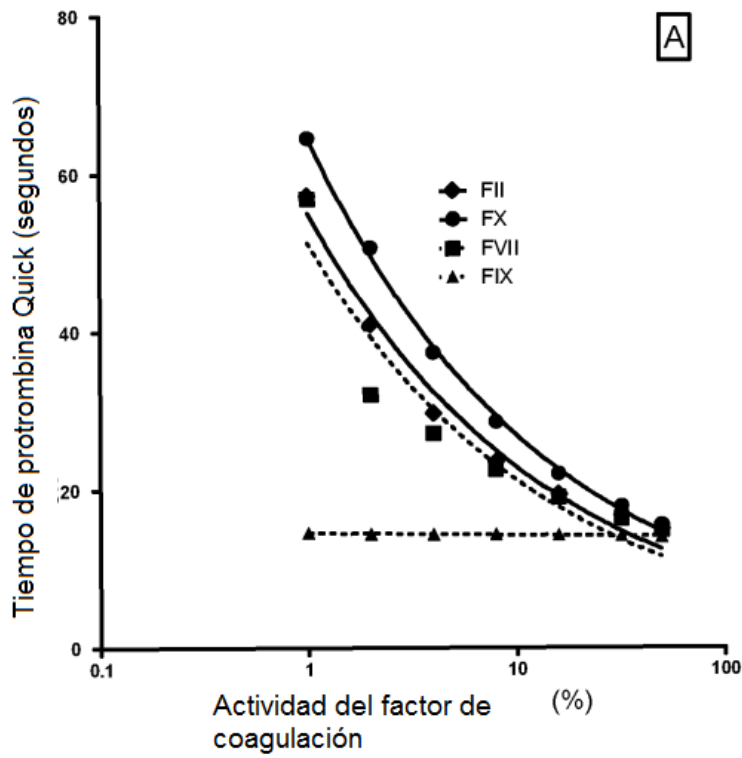


Figura 1A

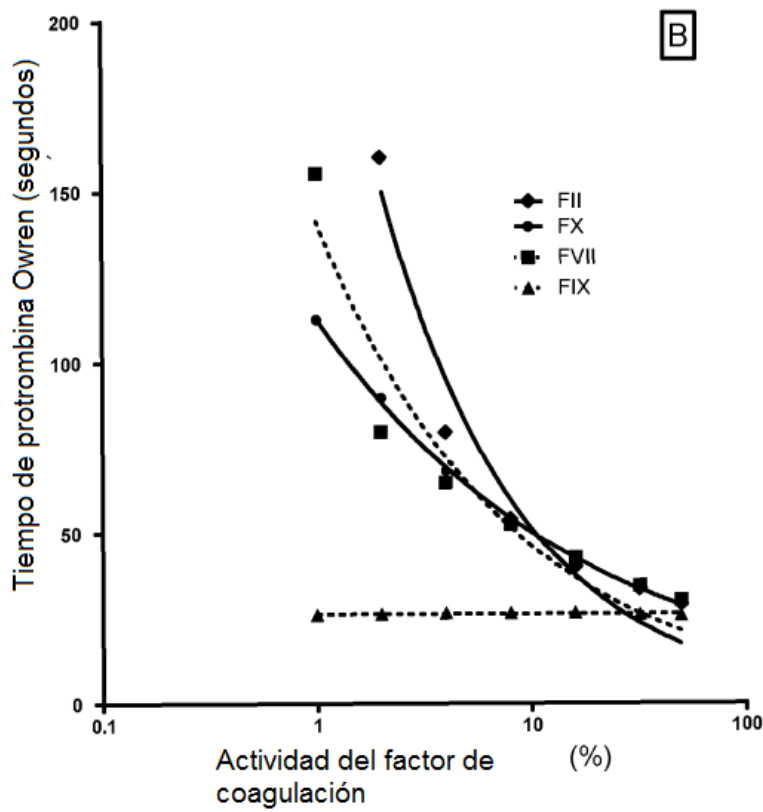


Figura 1B

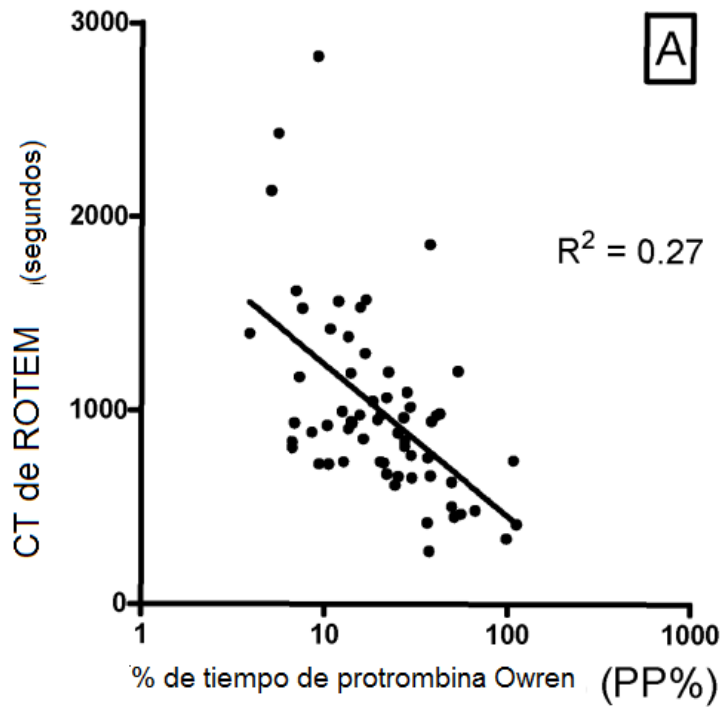


Figura 2A

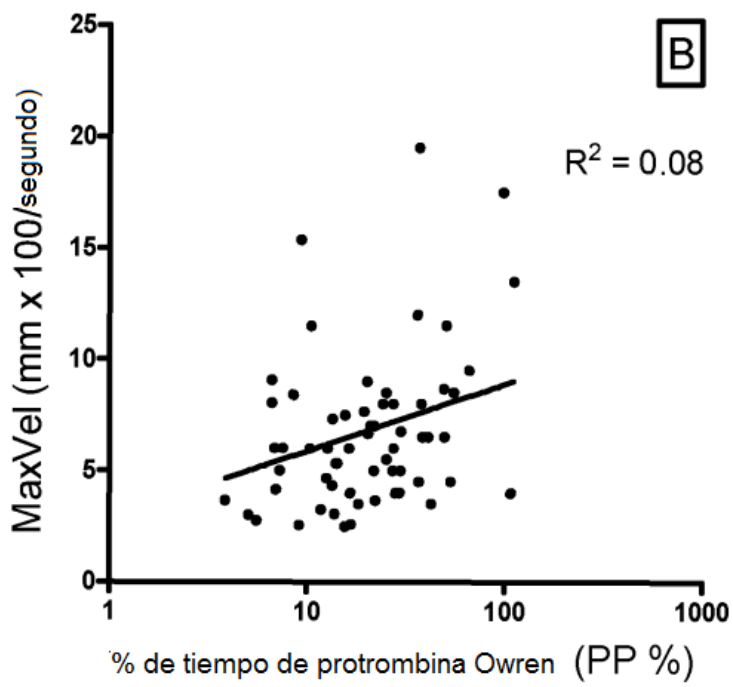


Figura 2B

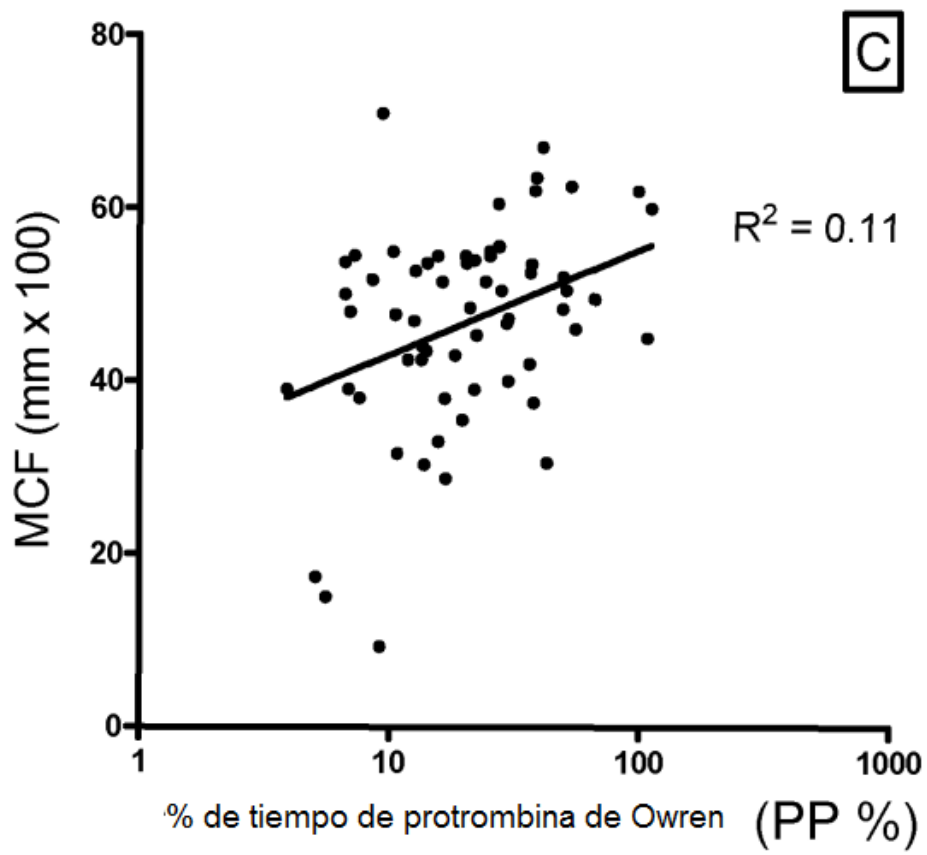


Figura 2C

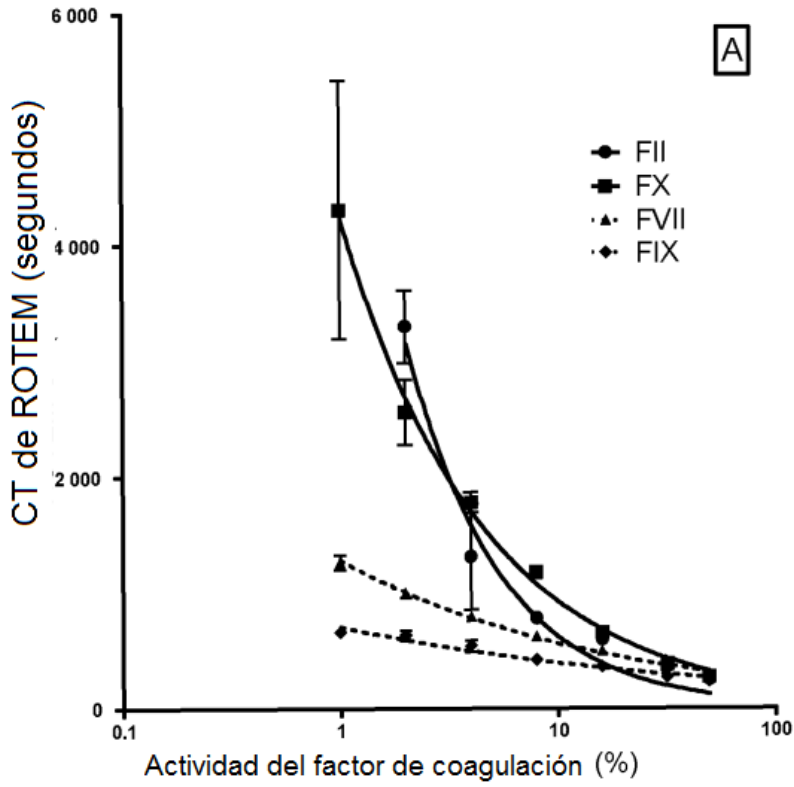


Figura 3A

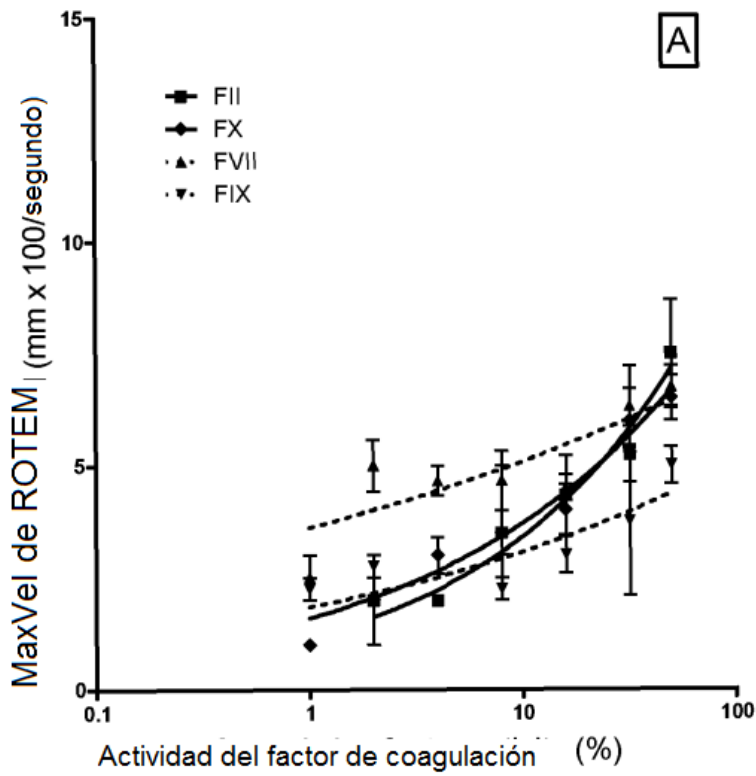


Figura 3B

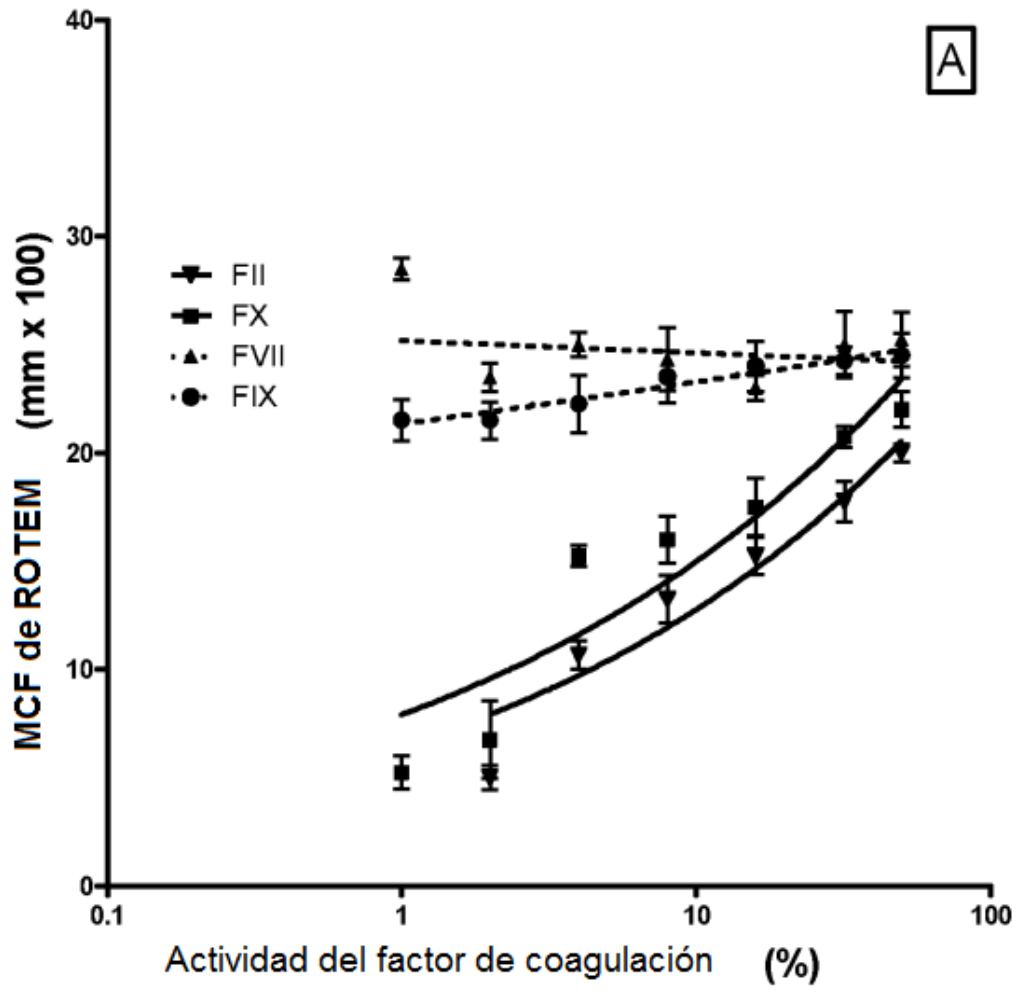


Figura 3C

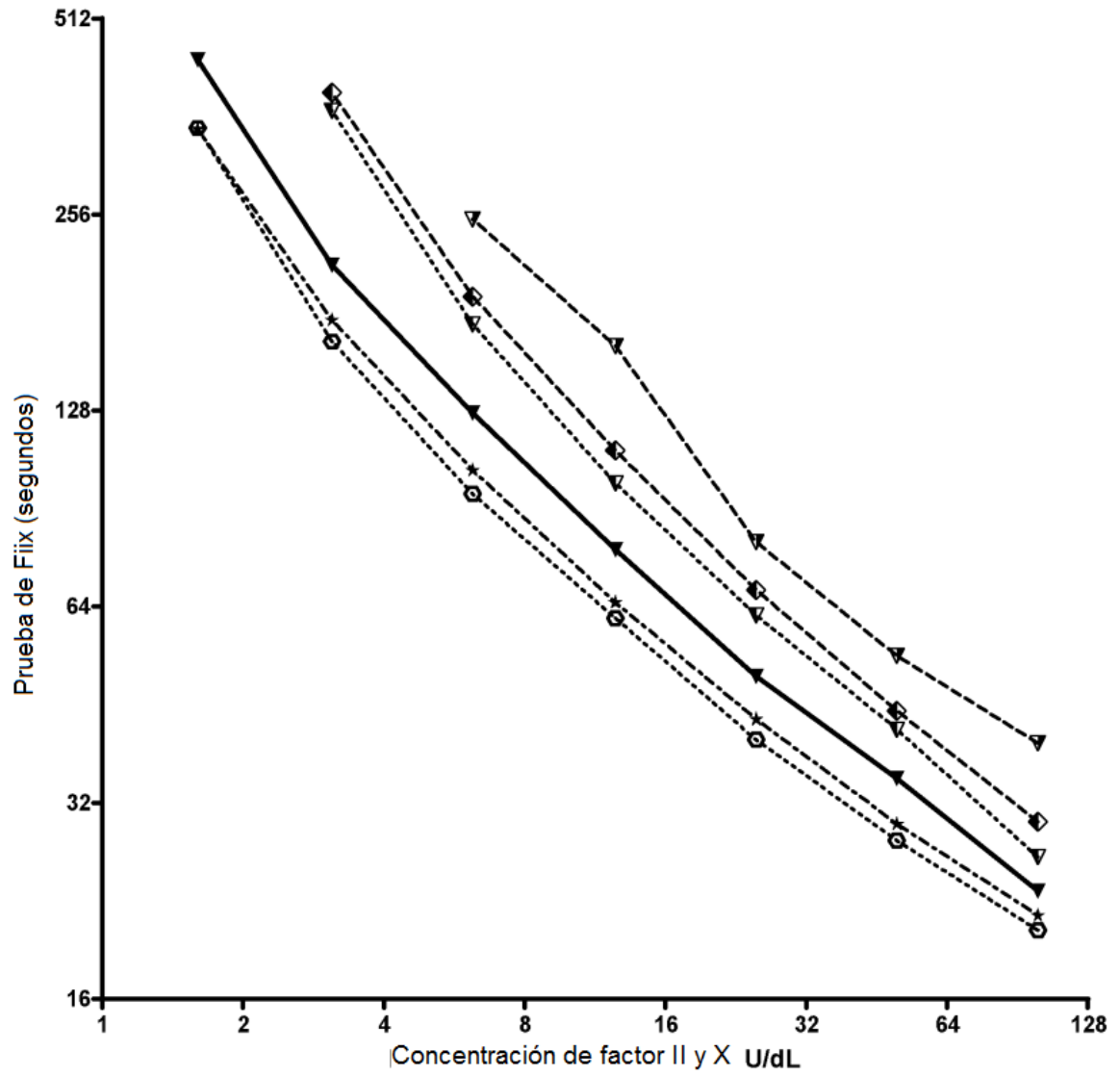


Figura 4

Correlación de INR de Fiix con la prueba P & P basada en INR en 38 muestras seleccionadas al azar de pacientes tratados con warfarina

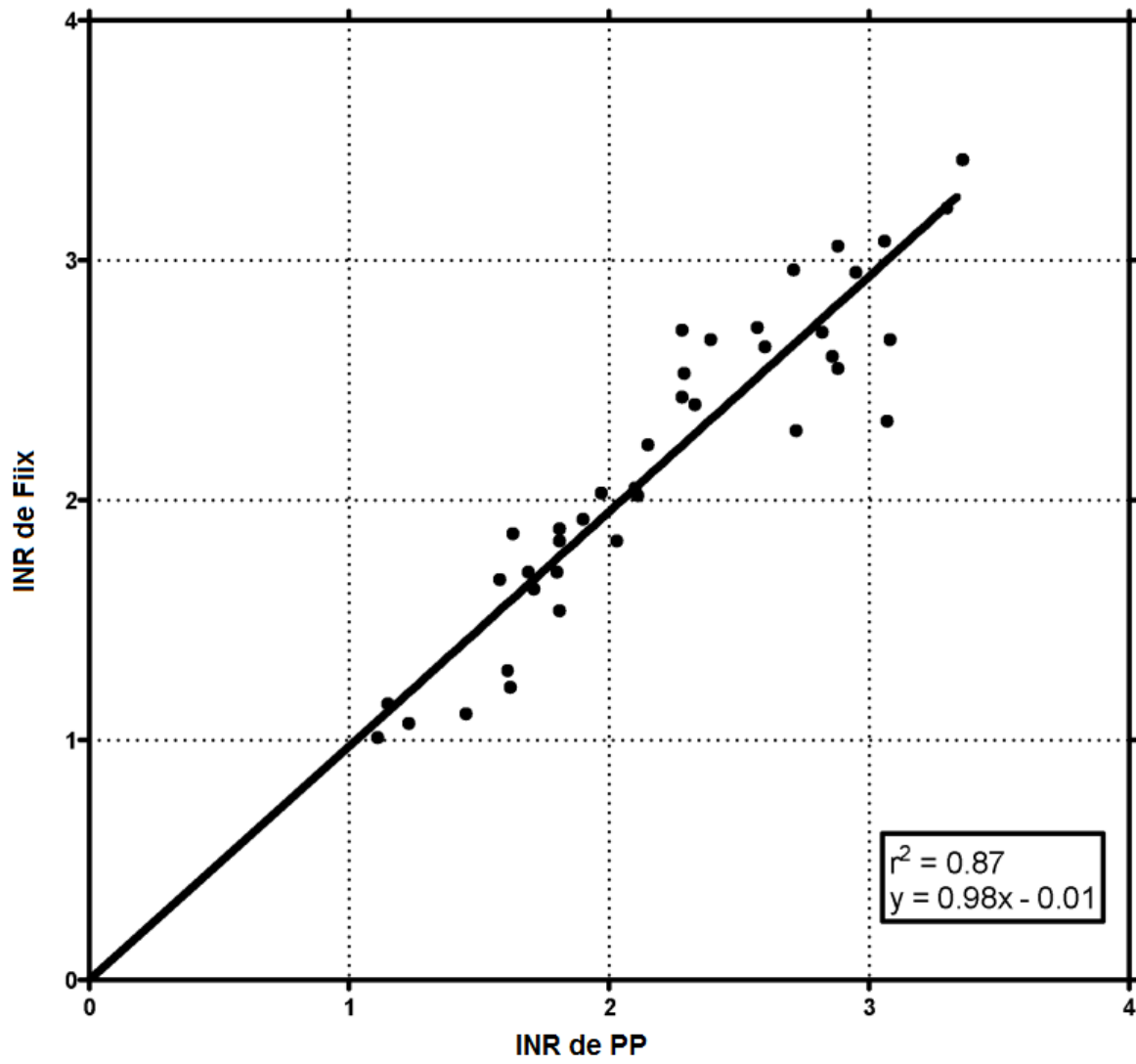


Figura 5

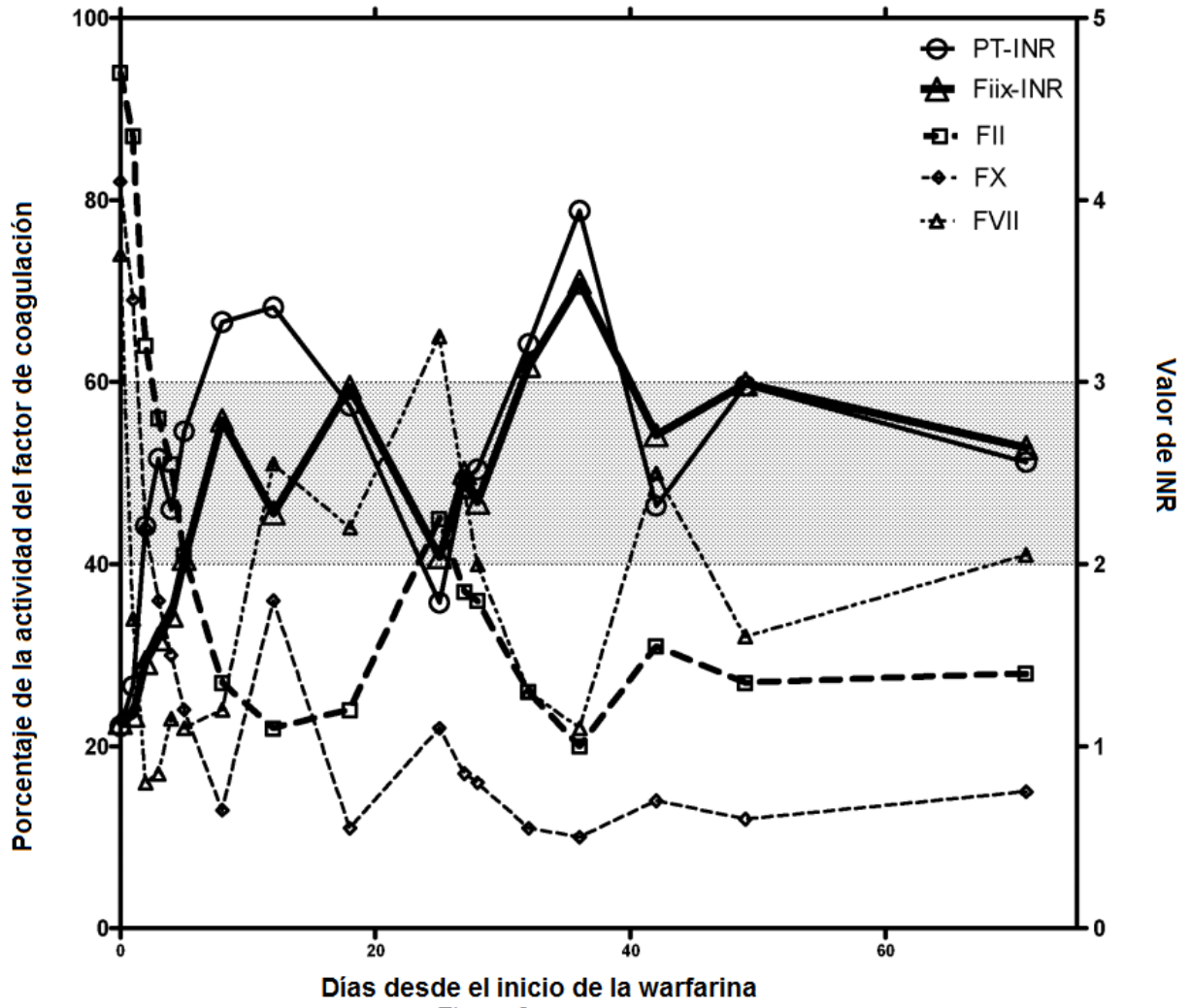


Figura 6