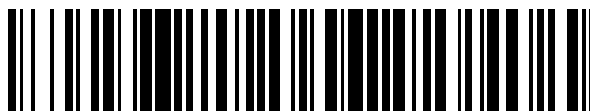


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 495**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

**C12Q 1/56** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012** **PCT/JP2012/065433**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012** **WO12173259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012** **E 12800902 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2722674**

54 Título: **Método para detectar anticoagulantes lúpicos**

30 Prioridad:

**17.06.2011 JP 2011135173**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.02.2018**

73 Titular/es:

**SCHOOL JURIDICAL PERSON HIGASHI-NIPPON-GAKUEN (50.0%)**

**1757, Aza Kanazawa Tobetsu-cho  
Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, JP y  
SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**IEKO, MASAHIRO y  
MORIKAWA, CHIZURU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 652 495 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

Método para detectar anticoagulantes lúpicos

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar la positividad de anticoagulante lúpico que se usa en el diagnóstico del síndrome del anticuerpo antifosfolípido.

## 10 Técnica anterior

El anticoagulante lúpico (AL) es un anticoagulante circulante sobre el que se ha informado por primera vez en pacientes con LES (Lupus Eritematoso sistémico). En el caso de pacientes AL positivos, desde un punto de vista clínico, apenas se reconoce diátesis hemorrágica, y los pacientes presentan bastante diátesis trombótica. Sin embargo, en el caso de muestras derivadas de pacientes AL positivos, se presenta *in vitro* una tendencia de prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) o el tiempo de protrombina (TP). A partir de la investigación que sigue, se aclaró que AL es un autoanticuerpo para complejos de fosfolípidos que tienen cargas negativas y proteínas en sangre tales como  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI) o protrombina, y actualmente se sabe que AL se detecta en cantidades grandes incluso en enfermedades aparte de LES. Particularmente, la frecuencia de ocurrencia es alta en las condiciones patológicas de enfermedades que generalmente se refieren como "síndrome antifosfolípido" (SAF), y AL se considera uno de los descubrimientos de laboratorio en relación a los criterios de diagnóstico para las enfermedades (Documento de No Patente 1).

AL se define como una inmunoglobulina que inhibe las reacciones de coagulación dependientes de fosfolípido *in vitro* (TTPA, tiempo de coagulación de Kaolín, tiempo de veneno de víbora de Russell diluido, y similares), sin inhibir las actividades del factor de coagulación individual, y AL no es un anticuerpo sencillo. Por ejemplo, como algunos ejemplos de anticuerpos responsables para AL, se han encontrado anticuerpo anti complejo cardiolipina- $\beta$ 2GPI, anticuerpo anti complejo fosfatidilserina-protrombina y similares, y hay sistemas de medición basados en el método ELISA. Sin embargo, no se niega la existencia de anticuerpos responsables para AL aparte de estos, e incluso si todos estos anticuerpos responsables ya son conocidos son negativos, aún hay casos en los que AL llega a ser positivo.

Como reactivos para la detección de AL, generalmente se usan los reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea que contienen fosfolípidos. Cuando AL está contenido en un espécimen, AL se une a fosfolípidos en el reactivo. Por lo tanto, los fosfolípidos requeridos para fomentar la reacción de coagulación *in vitro* llegan a ser insuficientes, y se prolonga el tiempo de coagulación sanguínea. Por consiguiente, la positividad de AL se puede determinar basándose en la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea. Ejemplos de reactivos para la detección de AL incluyen reactivos para TTPA, TP y tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd).

Además, también se ha llevado a cabo un ensayo de corrección de la coagulación sanguínea (más adelante, también referido como "ensayo de combinación" o "ensayo de mezcla") en el que se usa un reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea que contiene fosfolípidos, se añade plasma normal a un plasma de ensayo, y la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea del plasma de ensayo a corregir (normalizado) se traza en una gráfica para determinar la causa (Documento de No Patente 2).

Como reactivo comercialmente disponible para la detección de AL, se usa un reactivo para el análisis basado en TVVRd llamado ensayo de AL "GRADIPORE" (producido por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.). Con este reactivo, se determina la presencia o ausencia de AL en un espécimen sobre la base de la relación del tiempo de coagulación tomado mediante la adición del veneno de víbora de Russell y el tiempo de coagulación tomado mediante la adición del veneno de víbora de Russell y una concentración excesiva de fosfolípidos.

Además, además del reactivo anteriormente descrito, un reactivo para la detección de AL llamado STACLOT LA (fabricado por Diagnostica Stago, Inc.) también está comercialmente disponible. Con este reactivo, se determina la presencia o ausencia de AL en un espécimen examinando la diferencia en el tiempo de coagulación para TTPA entre una muestra obtenida añadiendo plasma normal y fosfolípidos en exceso al plasma de ensayo, y una muestra obtenida añadiendo solamente plasma normal al plasma de ensayo.

Sin embargo, en los métodos existentes anteriormente descritos, es difícil discriminar si la causa de la prolongación del tiempo de coagulación se encuentra simplemente en la deficiencia de factores de coagulación, en los inhibidores de los factores de coagulación, o en AL, solamente midiendo un artículo único usando cada uno de los reactivos. Por otro lado, puesto que la estrategia terapéutica puede variar dependiendo de la diferencia en la causa, es importante su discriminación. Por lo tanto, estos métodos de detección de AL apenas se usan por separado, y se recomienda combinar dos o más tipos de análisis y determinar compresivamente los resultados (Documento de No Patente 3).

**Documento de técnica relacionada**

## Documento de No Patente

- 5 Documento de No Patente 1: "INTERNATIONAL CONSENSUS STATEMENT ON PRELIMINARY CLASSIFICATION CRITERIA FOR DEFINITE ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME", *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 42, nº. 7, Julio 1999, pp. 1.309-1.311.
- Documento de No Patente 2: Kensa to Gijutsu (Examination and Technology), Vol. 34, nº. 8, Agosto 2006, pp. 735-742.
- 10 Documento de No Patente 3: "Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: pp. 1.737-1.740 (2009).

**Descripción de la invención**

## 15 Problema a resolver por la invención

Como se describió anteriormente, ha habido un problema, que para realizar la detección de AL, se tienen que combinar varios análisis haciendo el procedimiento de detección engorroso y complicado, y se necesita incluso entrenamiento para una interpretación de los resultados. Por ejemplo, cuando la determinación de la positividad y negatividad da diferentes resultados en diferentes tipos de métodos de detección de AL, se requiere un análisis que considera los principios de los diversos métodos de detección, y la determinación de la positividad o negatividad se tienen que hacer basándose en la posibilidad del falso negativo o falso positivo de los diversos métodos de detección. Por lo tanto, ha sido muy difícil discriminar claramente la presencia o ausencia del AL en los métodos de detección de AL existentes.

25 Además, muchos pacientes AL positivos presentan síntomas de trombosis, y en muchos casos, en el momento en el que se sospecha AL y se inicia un análisis, los pacientes pueden haber recibido ya terapia anticoagulante. Sin embargo, en el caso de muestras derivadas de pacientes que han recibido terapia anticoagulante, se sabe que la falsa positividad se puede dar en el TTPA y TVVRd, mientras que la falsa negatividad se puede dar en el ensayo de mezcla.

En la terapia anticoagulante, se usa heparina que da lugar a eficacia en el momento de la emergencia y así se puede administrar intravenosamente, y en la prevención basada en administración a largo plazo, se usa warfarina que es un anticoagulante peroral. La Warfarina suprime la biosíntesis del Factor II (protrombina), Factor VII, Factor IX y factor X entre los factores de coagulación sanguínea en el hígado antagonizando la acción de la vitamina K. Por lo tanto, en el caso de consumidores de warfarina, puesto que se disminuye la actividad de estos factores de coagulación, TTPA, TP o TVVRd se prolonga mucho independientemente de la presencia o ausencia de AL. Además, en el ensayo de mezcla, hay ocasiones en las que los pacientes se consideran como tipo deficiencia de factor independientemente la presencia o ausencia de AL. También, puesto que la heparina activa la antitrombina y activa la acción de anticoagulación para suprimir de ese modo la coagulación, la heparina prolonga mucho el tiempo de coagulación independientemente de la presencia o ausencia de AL:

Por lo tanto, se recomienda por la "International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)" que en el momento de la detección de AL, en muestras derivadas de pacientes administrados con warfarina, la medición se haga después de que el plasma de ensayo se mezcle con una cantidad igual de un plasma de persona sana para complementar algún factor de coagulación insuficiente. Con respecto al plasma de persona sana, los plasmas que se han sometido a doble centrifugación de manera que el número de plaquetas sanguíneas es menor de  $10^7/\text{ml}$ , y se han acondicionado de modo que la actividad de todos los factores de coagulación sanguínea es casi 100 %, se producen en diversas instalaciones y se usan (Documento de No Patente 3). Sin embargo, entre los factores de coagulación sanguínea, hay factores que tienen mucha actividad inestable y son propensos a inactivarse. Por tanto, es muy difícil preparar dicho plasma de persona sana, y hay un problema, que no es fácil la adquisición estable del mismo.

Además, en la preparación del plasma de persona sana, ya que aumenta el número de personas cuyos plasmas se almacenan (agrupan) y mezclan, se puede calcular el promedio de las variaciones en los individuos de la actividad de los factores de coagulación. Sin embargo, el número requerido de personas sanas no se puede asegurar en muchas instalaciones, y puesto que se dan desviaciones en los proveedores de plasma, hay un problema, que se pueden dar diferencias en la calidad del producto entre diferentes lotes. Además, en el método de usar un plasma de persona sana, no solamente se diluye el AL en el plasma de ensayo, sino también se pueden incorporar sustancias que inhiben la medición de AL contenido en el plasma de persona sana (fosfolípidos, membranas alteradas derivadas de plaquetas, y similares). Por lo tanto, particularmente en el caso donde AL es débilmente positivo, hay un problema, que hay una posibilidad de estar detectando falsa negatividad.

Incluso durante el periodo en el que se suprimen los síntomas de la trombosis por terapia anticoagulante, la discriminación de las causas de los síntomas de trombosis es importante debido a que la estrategia terapéutica es dependiente de las mismas. Además, incluso en el caso donde se detecta inicialmente positividad de AL y se inicia

la terapia anticoagulante, hacer un seguimiento del incremento y disminución de AL se considera muy útil. Sin embargo, actualmente, no existe un método por el que se realiza convenientemente el seguimiento.

Por lo tanto, ha habido una fuerte demanda del desarrollo de un método conveniente para la detección de AL en el que incluso para una muestra derivada de un paciente que recibe terapia anticoagulante que usa warfarina o heparina, se puede alcanzar discriminación a partir de la deficiencia de factores de coagulación sanguínea sin estar afectada por la terapia anticoagulante, y se no se usa plasma de persona sana.

#### Medios para resolver el problema

Por lo tanto, los inventores de la presente invención dirigieron diversas investigaciones para resolver los problemas anteriormente descritos, y como resultado, los inventores encontraron que cuando se preparan una muestra de sangre y una muestra diluida de la misma, se añade una composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea (más adelante, también referida como reactivo auxiliar) a cada una de las muestras antes de la medición o en el mismo momento de la medición del tiempo de coagulación sanguíneo de cada una de las muestras, se mide el tiempo de coagulación sanguínea para cada una de las muestras, y se comparan los tiempos de coagulación sanguínea para aquellas muestras, AL se puede detectar con sensibilidad y especificidad más satisfactoria que los métodos convencionales, sin estar afectadas por terapia anticoagulante. Por tanto, los inventores completaron la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona un método para detectar anticoagulantes lúpicos, incluyendo el método las siguientes etapas (A), (B) y (C):

- (A) añadir una composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea a cada una de una muestra de sangre y una muestra diluida de la muestra de sangre antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea;
- (B) medir los tiempos de coagulación sanguínea para las diversas muestras de la etapa (A); y
- (C) comparar los tiempos de coagulación sanguínea para las diversas muestras obtenidas en la etapa (B), como se define por la reivindicación 1.

#### Efecto de la invención

Según la presente invención, incluso para una muestra derivada de un paciente que está recibiendo terapia anticoagulante que usa warfarina, heparina o similares, la presencia o ausencia de AL se puede confirmar específicamente de manera conveniente con sensibilidad mayor que los métodos convencionales, sin estar afectado por la terapia anticoagulante. Por lo tanto, hay una necesidad de prestar atención a si el paciente está recibiendo o no terapia anticoagulante. También, puesto que no es necesario preparar plasma de persona sana para la medición del tiempo de coagulación para la detección de AL, se pueden resolver los problemas de la diferencia entre diferentes lotes de plasma de persona sana, lo cual ha sido convencionalmente un problema, y la adquisición estable.

#### El mejor modo de llevar a cabo la invención

El método de detección de AL de la presente invención se caracteriza por llevar a cabo las etapas (A), (B) y (C). Más particularmente, el método de detección de AL se caracteriza por que una muestra de sangre y una muestra diluida de la muestra de sangre (más adelante, también referida simplemente como muestra diluida) se usan como muestras de medición, se añade una composición solución tampón que contiene los factores de coagulación sanguínea a cada una de las muestras, posteriormente se miden los tiempos de coagulación sanguínea, y se comparan los tiempos de coagulación de las muestras. En el caso de un paciente AL negativo, puesto que se disminuye la cantidad de factores de coagulación en la muestra diluida, el tiempo de coagulación se prolonga en comparación con la muestra que no está diluida. En el caso de un paciente AL positivo, puesto que la muestra diluida tiene una cantidad disminuida de factores de coagulación así como una cantidad disminuida de AL, se incrementa la cantidad de fosfolípidos que no se unen con AL en el reactivo, y así, se dan simultáneamente una reacción por la cual se prolonga el tiempo de coagulación y una reacción por la cual se acorta el tiempo de coagulación, en comparación con una muestra que no está diluida. Cuando el título de AL (anticuerpo) para capturar fosfolípidos es alto, el tiempo de coagulación se acorta en comparación con una muestra que no está diluida.

La muestra sanguínea que se usa en el método de la presente invención es preferiblemente sangre completa o plasma, y normalmente, la muestra de sangre se prepara añadiendo un anticoagulante tal como citrato de sodio a la sangre recogida de un sujeto. Entre tales muestras de sangre, en el caso de tratar con muestras de sangre derivadas de aquellos sujetos para los que la detección de AL convencional ha sido difícil, la presente invención es particularmente útil. Ejemplos de tal muestra de sangre incluyen muestras de sangre de consumidores de warfarina, personas que reciben terapia anticoagulante tal como terapia de heparina, personas que padecen de deficiencia de vitamina K, y pacientes con insuficiencia hepática.

La relación de dilución de la muestra diluida es preferiblemente 1,1 veces o más, más preferiblemente 1,1 a 3 veces, e incluso más preferiblemente 1,5 a 3 veces. El líquido diluyente usado para la dilución de la muestra de sangre es preferiblemente una solución tampón. Mientras tanto, cuando la muestra de sangre se ha diluido de antemano, la muestra diluida se usa después de ser diluida más.

5 En la etapa (A) del método de la presente invención, una composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea se añade a tanto una muestra de sangre como una muestra diluida. Cuando se mide el tiempo de coagulación en una muestra obtenida diluyendo el plasma de una paciente AL positivo, la prolongación del tiempo de coagulación causado por un descenso en la actividad del factor de coagulación y el acortamiento del tiempo de coagulación causado por dilución de AL ambos se antagonizan. Cuando la actividad del factor de coagulación del plasma del paciente se ha disminuido debido a la administración de warfarina o similares, la prolongación del tiempo de coagulación es probable que sea predominante. Por consiguiente, en la presente invención, para suprimir la prolongación del tiempo de coagulación causado por un descenso en la actividad del factor de coagulación, y para incrementar la sensibilidad a AL, se añade una composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea a tanto la muestra de sangre como la muestra diluida.

Con respecto a los factores de coagulación sanguínea que están contenidos en la composición solución tampón usada en la presente invención, los factores de coagulación sanguínea que se consideran que son deficientes en la muestra de sangre a ensayar, o los factores de coagulación que están implicados en la reacción de medición de del reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea usados se seleccionan y se usan apropiadamente. Específicamente, los factores de coagulación sanguínea incluyen al menos uno de los factores de coagulación sanguínea seleccionados de FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII. Además, los factores de coagulación sanguínea preferiblemente incluyen un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII, y más preferiblemente incluyen al menos un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII, FVII, FIX y FX. Además, en el caso de la medición del TP, los factores de coagulación sanguínea preferiblemente incluyen un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII, FVII y FX. En el caso de la medición del TTPA, los factores de coagulación sanguínea preferiblemente incluyen un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII, y particularmente preferiblemente incluyen un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII y FIX. También, en el caso de la medición del TVVRd, los factores de coagulación sanguínea preferiblemente incluyen un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII y FX.

La concentración de los factores de coagulación es, después que se haya añadido una composición solución tampón a la muestra de sangre a ensayar, preferiblemente 0,01 U/ml a 2,0 U/ml, y más preferiblemente 0,1 U/ml a 1,0 U/ml. Por ejemplo, en el caso de mezclar la muestra de sangre a ensayar y la composición solución tampón a una proporción de 9:1, la concentración de los factores de coagulación en la composición solución tampón es preferiblemente 0,1 U/ml a 20 U/ml, y más preferiblemente 1 U/ml a 10 U/ml.

El pH de la solución tampón puede ser cualquier pH que no desactive los factores de coagulación sanguínea contenidos en el reactivo auxiliar, y el pH es preferiblemente pH 6 a 9, y más preferiblemente pH 6,5 a 8,0. Con respecto a la solución tampón, se puede usar apropiadamente cualquier solución tampón conocida, tal como una buena solución tampón como HEPES. La concentración de la solución tampón puede ser cualquier concentración en la que se mantenga la capacidad tampón durante el almacenaje, y la concentración es preferiblemente 5 mM a 100 mM, y más preferiblemente 5 mM a 50 mM.

Además, en el reactivo auxiliar, se puede añadir apropiadamente cualquier compuesto conocido como estabilizador de los factores de coagulación sanguínea. Por ejemplo, se puede añadir glicilglicina, glicilglicilglicina y similares que se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa (JP-B) N° 06-050999.

En el método de la presente invención, se añade una composición solución tampón que contiene los factores de coagulación sanguínea anteriormente descritos a una muestra de sangre y una muestra diluida antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea. En el presente documento, la adición de una composición solución tampón antes de la medición del tiempo de coagulación sanguínea corresponde a un pretratamiento de la muestra de sangre y la muestra diluida. Es decir, la composición solución tampón se añade a una muestra de sangre y una muestra diluida para pretratar la muestra de sangre y la muestra diluida y, a continuación, el tiempo de coagulación sanguínea se mide usando un reactivo para la medición de la coagulación sanguínea. Por otro lado, la adición de una composición solución tampón en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea corresponde a un proceso de adición de la composición solución tampón a una parte del reactivo para la medición de la coagulación sanguínea y medir el tiempo de coagulación sanguínea. Entre estos tiempos de adición, es preferible añadir la composición solución tampón a la muestra de sangre y la muestra diluida antes de la medición del tiempo de coagulación sanguínea, desde el punto de vista de que la estabilidad de almacenamiento de los factores de coagulación incorporados en la composición solución tampón se asegura fácilmente.

Con respecto al reactivo para la medición del tiempo de coagulación, se puede usar cualquier reactivo dependiente de fosfolípido para la medición del tiempo de coagulación sanguínea o método de medición que presenta sensibilidad a AL, y se puede usar cualquier reactivo conocido para medir el tiempo de protrombina (TP), el tiempo

de tromboplastina parcial activada (TTPA), TP diluida (TPd), TTPA diluida (TTPAd), tiempo de coagulación de Kaolín (TCK), tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd) y similares. Estos reactivos conocidos se preparan combinando apropiadamente fosfolípidos tales como cefalina, agentes de activación de factor de contacto que contienen un cuerpo negativamente cargado tales como kaolín como componente principal, compuestos que inducen  $\text{Ca}^{2+}$  tales como cloruro de calcio, veneno de víbora, y similares; según el principio de medición. Con respecto a la forma del reactivo, se puede seleccionar apropiadamente un estado seco que se disuelve en el momento de su uso, un estado en solución, o similares. Para los reactivos anteriormente descritos, se pueden usar productos comercialmente disponibles en todos los casos. Ejemplos de los reactivos para la medición de TP que están comercialmente disponibles incluyen COAGPIA (marca comercial registrada) PT-N (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), THROMBOCHECK PT PLUS (fabricado por Sysmex Corp.), y Serie de Reactivo STA PT (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Ejemplos de los reactivos para la medición de TTPA que están comercialmente disponibles incluyen COAGPIA (marca comercial registrada) APTT-N (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), THROMBOCHECK APTT-SLA (fabricado por Sysmex Corp.), APTT líquido "RD" y reactivo PTT-LA "RD" (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Ejemplos de los reactivos para la medición de TVVRd que están comercialmente disponibles incluyen el ensayo de AL "GRADIPORE" (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.). Además, uno o más de estos reactivos y la composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea de la presente invención (reactivo auxiliar) se pueden combinar y usar como kit de reactivo para la detección de AL.

Como método de comparación de los tiempos de coagulación de una muestra de sangre y una muestra diluida, se puede calcular la relación. Por ejemplo, en el caso de tomar el tiempo de coagulación de la muestra de sangre como referencia, la relación se calcula por la siguiente fórmula:

$$\text{Relación} = (\text{tiempo de coagulación de muestra diluida}) / (\text{tiempo de coagulación de muestra de sangre})$$

En este caso, cuando la relación es mayor, puesto que el tiempo de coagulación de la muestra diluida se prolonga, se considera que es AL negativo. Cuando la relación es menor, se considera que es AL positivo.

El valor de corte para determinar la negatividad o positividad deseablemente se calcula estadísticamente por un método general a partir de los valores medidos de plasmas de persona sana sin anomalía de coagulación. Por ejemplo, el valor promedio y la desviación estándar (SD) se determinan a partir de los valores medidos de los plasmas de 20 o más personas sanas, y se calcula el valor de (valor promedio +2SD (dependiendo de los casos, valor promedio -2SD)). Alternativamente, el valor de corte se determina por un método percentil.

### 35 Ejemplos

La presente invención se describirá a más detalle por los siguientes Ejemplos, pero la presente invención no intenta limitarse a los siguientes Ejemplos.

#### 40 Artículos de medición

##### (1) Ensayo de cribado de TTPA

La medición se llevó a cabo usando un reactivo PTT LA, "RD" (fabricado por Diagnostica Stago, Inc.), y un analizador de coagulación sanguínea automático, STA-R (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Con respecto a la determinación del valor de corte, se usó el valor de (valor medido de 20 o más personas sanas +2SD).

##### (2) Ensayo de TVVRd

La medición se llevó a cabo usando un ensayo de AL "GRADIPORE" (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) y un analizador de coagulación sanguínea automático, STA-R. Con respecto al valor de corte para la determinación, se usó el valor de (valor medido de 20 o más personas sanas +2SD).

##### (3) Ensayo de mezcla

La medición se llevó a cabo usando un reactivo PTT LA, "RD" (fabricado por Diagnostica Stago, Inc.) y un analizador de coagulación sanguínea automático, CP2000 (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.). Como plasma normal, se usó Pool de Plasma Normal (más adelante, PPN; Precision Biologic, Inc.). La proporción de mezcla de muestra se fijó a 0 %, 10 %, 20 %, 50 % y 100 %, y la medición se llevó a cabo diluyendo automáticamente la muestra usando la función de ensayo de mezcla de CP2000. La determinación se realizó de modo que se dibujaba una gráfica, y si la gráfica era convexa, se determinaba que la muestra era AL positiva.

##### (4) Modificación del ensayo de TTPA (método de la presente invención)

La medición se llevó a cabo usando COAGPIA APTT-N (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) y una solución tampón que contenía los factores de coagulación sanguínea que se describirá más adelante (más adelante, reactivo

auxiliar), y usando un analizador de coagulación sanguínea automática, CP2000 (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), con los parámetros de medición indicados en la Tabla 1. Específicamente, primero, se añade 5 µl del reactivo auxiliar a 45 µl del plasma de ensayo, y se mide TTPA usando esta mezcla como muestra (condición 1). A continuación, se añade 5 µl del reactivo auxiliar a una dilución del plasma de ensayo con HBS (HEPES 50 mM a pH 7,5, y cloruro de sodio 150 mM) (plasma 25 µl: HBS 20 µl), y se mide TTPA usando esta mezcla como muestra (condición 2). Cuando el TTPA de la condición 1 se define como A segundos, y el TTPA de la condición 2 se define como B segundos, B/A (relación) se calcula como un valor medido para la determinación. En las Invenciones 1 y 2 que se describirán más adelante, puesto que se discrimina la presencia o ausencia de AL basándose en el acortamiento del tiempo de coagulación en el momento de la dilución, una relación menor representa positividad. Con respecto al valor de corte para la determinación, se usó el valor de (valor medido del plasma de 20 o más personas sanas -2SD)

Tabla 1

| Parámetros de medida    |                  |       |                   |                |               |                |                               |
|-------------------------|------------------|-------|-------------------|----------------|---------------|----------------|-------------------------------|
|                         | Plasma de ensayo | HBS   | Reactivo auxiliar |                | Reactivo TTPA |                | Solución de cloruro de calcio |
| Condición de medición 1 | 45 µl            | -     | 5 µl              | →Incubado<br>→ | 50 µl         | →Incubado<br>→ | 50 µl                         |
| Condición de medición 2 | 25 µl            | 20 µl | 5 µl              | →Incubado<br>→ | 50 µl         | →Incubado<br>→ | 50 µl                         |

#### Reactivo auxiliar

El reactivo auxiliar 1 y el reactivo auxiliar 2 se prepararon añadiendo los factores de coagulación sanguínea indicados en la Tabla 2 a HBS (HEPES 50 mM pH 7,5, y cloruro de sodio 150 mM) como base. Para los factores de coagulación sanguínea, se usaron los productos fabricados por Haematologic Technologies, Inc. en todos los casos.

Además, en la Tabla 3 a la Tabla 6 que se describen más adelante, los resultados obtenidos en el caso de usar el reactivo auxiliar 1 se representan como "Invención 1", y los resultados obtenidos en el caso de usar el reactivo auxiliar 2 se presentan como "Invención 2".

Tabla 2

| Composición del reactivo auxiliar |                  |                  |                    |
|-----------------------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                                   | Factor Humano II | Factor Humano IX | Factor Humano VIII |
| Reactivo auxiliar 1               | 200 µg/ml        | 2 U/ml           | -                  |
| Reactivo auxiliar 2               | 200 µg/ml        | 2 U/ml           | 2 U/ml             |

En la Tabla 2 anteriormente descrita, 200 µg/ml de Factor Humano II corresponde a 2 U/ml.

#### Plasma de ensayo

- Los plasmas de ensayo A, B y C son plasmas recogidos de pacientes que reciben administración de warfarina. Como se ve a partir de los síntomas clínicos y similares, se niega la presencia de AL.
- Los plasmas de ensayo 1 y 2 son plasmas en los que el factor de coagulación sanguínea VIII y el factor de coagulación sanguínea IX son deficientes. Los pacientes no reciben la administración de un anticoagulante.
- Los plasmas de ensayo 3 a 10 son plasmas recogidos de pacientes que reciben la administración de heparina, que es un anticoagulante. Como se ve a partir de los síntomas clínicos y similares, se niega la presencia de AL.
- Los plasmas de ensayo 11 a 37 son plasmas recogidos de pacientes que se sospecha que llevan anticuerpos antifosfolípido, según las enfermedades subyacentes o síntomas clínicos. Entre estos, los plasmas 11 a 24 son plasmas recogidos de pacientes que reciben administración de warfarina.

#### Resultados

Como se enumera en la Tabla 3, en el grupo de administrado con warfarina/no AL, los valores resultado son todos mayores de o iguales al valor de corte en el ensayo de cribado de TTPA, de manera que es difícil la discriminación de la positividad de AL. Además, en el ensayo de TVVRd, dos muestras de tres muestras mostraron falsa positividad (en la tabla, indicado como "positivo\*"). Por otro lado, los resultados eran todos negativos en el ensayo de mezcla e Invenciones 1 y 2

Tabla 3

| Determinación de especímenes administrados con warfarina en los que se niega la presencia de AL |      |                    |       |               |                    |               |     |                  |                    |               |               |                    |      |               |                    |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------|-------|---------------|--------------------|---------------|-----|------------------|--------------------|---------------|---------------|--------------------|------|---------------|--------------------|--|--|
| Artículo                                                                                        |      | Cribado de TTPA    |       |               | TVVRd              |               |     | Ensayo de mezcla |                    | Inventación 1 |               |                    |      | Inventación 2 |                    |  |  |
| Unidad                                                                                          | seg  | Determi-<br>nación | seg   | Rela-<br>ción | Determi-<br>nación | Determinación | seg | Rela-<br>ción    | Determi-<br>nación | seg           | Rela-<br>ción | Determi-<br>nación | seg  | Rela-<br>ción | Determi-<br>nación |  |  |
| Valor de corte                                                                                  | 48,4 |                    |       | 1,25          |                    |               |     |                  |                    |               | 1,30          |                    |      | 1,35          |                    |  |  |
| Especímen A<br>(administrado<br>con warfarina)                                                  | 53,1 | Positivo           | 56,8  | 48,0          | 1,18               | Negativo      |     |                  | Negativo           | 33,7          | 47,8          | Negativo           | 29,8 | 43,5          | Negativo           |  |  |
| Especímen B<br>(administrado<br>con warfarina)                                                  | 57,4 | Positivo           | 77,9  | 54,8          | 1,42               | Positivo*     |     |                  | Negativo           | 33,9          | 49,3          | Negativo           | 30,3 | 45,8          | Negativo           |  |  |
| Especímen C<br>(administrado<br>con warfarina)                                                  | 78,7 | Positivo           | 112,4 | 67,6          | 1,66               | Positivo*     |     |                  | Negativo           | 39,0          | 56,1          | Negativo           | 34,5 | 53,0          | Negativo           |  |  |

5 Como se enumera en la Tabla 4, en los plasmas de pacientes deficientes en factor de coagulación (FVIII y FIX) en los que se niega la presencia de AL, los valores resultado fueron mayores de o iguales al valor de corte en el ensayo de cribado de TTPA, de manera que es difícil la discriminación de la positividad de AL. Por otro lado, en el ensayo de TVVRd, el ensayo de mezcla, y los Inventos 1 y 2, los valores resultado eran todos negativos. El método de la presente invención implica un sistema en el que los factores de coagulación se complementan a un plasma de ensayo; sin embargo, puesto que el método incluye un proceso de comparación de los valores obtenidos antes y después de la dilución, los resultados obtenidos en un estado en el que simplemente los factores de coagulación son deficientes, y los resultados en el caso que es positivo a inhibidor no son ambiguos. La discriminación se puede hacer claramente como en el caso del ensayo de TVVRd o el ensayo de mezcla.

Tabla 4

| Determinación de plasmas deficientes del factor de coagulación en los que se niega la presencia de AL |                 |               |      |       |          |               |                  |             |       |          |             |          |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|------|-------|----------|---------------|------------------|-------------|-------|----------|-------------|----------|---------------|
| Artículo                                                                                              | Cribado de TTPA |               |      | TVVRd |          |               | Ensayo de mezcla | Inversión 1 |       |          | Inversión 2 |          |               |
| Unidad                                                                                                | seg             | Determinación | Seg  | Seg   | Relación | Determinación | Determinación    | Seg         | Seg   | Relación | Seg         | Relación | Determinación |
| Valor de corte                                                                                        | 48,4            |               |      |       | 1,25     |               |                  |             |       | 1,30     |             | 1,35     |               |
| Espécimen 1<br>(deficiente en factor 8)                                                               | 153,6           | Positivo      | 33,8 | 36,3  | 0,93     | Negativo      | Negativo         | 99,7        | 133,8 | 1,34     | 36,8        | 1,56     | Negativo      |
| Espécimen 2<br>(deficiente en factor 9)                                                               | 149,2           | Positivo      | 80,4 | 74,2  | 1,08     | Negativo      | Negativo         | 33,3        | 44,2  | 1,33     | 30,7        | 1,37     | Negativo      |

Como se enumera en la Tabla 5, en el grupo de administrado con heparina/no AL, los valores resultado en siete ejemplos de ocho ejemplos son todos mayores de o iguales al valor de corte en el ensayo de cribado de TTPA, de manera que es difícil la discriminación a partir de la positividad de AL. Además, en el ensayo de TVVRd, dos ejemplos de ocho ejemplos mostraron falsa positividad (en la tabla, indicado como "positivo\*"). Por otro lado, los resultados eran todos negativos en las Inversiones 1 y 2.

Tabla 5

| Determinación de especímenes administrados con heparina en los que se niega la presencia de AL |                 |               |       |          |               |           |             |          |               |             |          |       |               |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|-------|----------|---------------|-----------|-------------|----------|---------------|-------------|----------|-------|---------------|----------|
| Artículo                                                                                       | Cribado de TTPA |               | TVVRd |          |               |           | Inversión 1 |          |               | Inversión 2 |          |       | Determinación |          |
|                                                                                                | seg             | Determinación | Seg   | Relación | Determinación | Seg       | Seg         | Relación | Determinación | Seg         | Relación |       |               |          |
| Valor de corte                                                                                 | 48,4            |               |       | 1,25     |               |           |             | 1,30     |               |             | 1,35     |       |               |          |
| Especímen 3<br>(administrado con heparina)                                                     | 202,0           | Positivo      | 48,9  | 43,5     | 1,12          | Negativo  | 88,2        | 148,0    | 1,68          | Negativo    | 70,0     | 126,7 | 1,81          | Negativo |
| Especímen 4<br>(administrado con heparina)                                                     | 96,1            | Positivo      | 54,0  | 43,6     | 1,24          | Negativo  | 49,3        | 71,7     | 1,45          | Negativo    | 42,6     | 65,8  | 1,54          | Negativo |
| Especímen 5<br>(administrado con heparina)                                                     | e.              | Positivo      | 39,6  | 37,2     | 1,06          | Negativo  | 45,5        | 71,0     | 1,56          | Negativo    | 39,9     | 66,1  | 1,66          | Negativo |
| Especímen 6<br>(administrado con heparina)                                                     | 61,4            | Positivo      | 60,5  | 47,7     | 1,27          | Positivo* | 43,8        | 63,7     | 1,45          | Negativo    | 38,1     | 60,5  | 1,59          | Negativo |
| Especímen 7<br>(administrado con heparina)                                                     | 45,6            | Negativo      | 38,3  | 33,8     | 1,13          | Negativo  | 40,8        | 64,7     | 1,59          | Negativo    | 36,3     | 58,0  | 1,60          | Negativo |
| Especímen 8<br>(administrado con heparina)                                                     | 145,2           | Positivo      | 64,9  | 46,8     | 1,39          | Positivo* | 76,4        | 118,8    | 1,55          | Negativo    | 61,9     | 100,6 | 1,63          | Negativo |
| Especímen 9<br>(administrado con heparina)                                                     | 57,1            | Positivo      | 40,8  | 38,5     | 1,06          | Negativo  | 47,7        | 73,7     | 1,55          | Negativo    | 44,6     | 67,6  | 1,52          | Negativo |
| Especímen 10<br>(administrado con heparina)                                                    | 56,3            | Positivo      | 41,7  | 36,6     | 1,14          | Negativo  | 39,8        | 60,2     | 1,51          | Negativo    | 36,9     | 57,5  | 1,56          | Negativo |
| e.: error que se desvía del intervalo de medición                                              |                 |               |       |          |               |           |             |          |               |             |          |       |               |          |

- La Tabla 6 enumera los resultados de un grupo de espécimen que se sospecha que tiene AL. En el grupo administrado con warfarina los valores resultado en trece ejemplos de catorce ejemplos eran mayores de o iguales al valor de corte en el ensayo de cribado de TTPA; sin embargo, cuando se consideran los resultados de la Tabla 3, la discriminación a partir de la positividad AL es difícil. También, en el ensayo de TVVRd, los resultados de trece ejemplos de catorce ejemplos eran positivos; sin embargo, puesto que a partir de los resultados de la Tabla 3 se sugiere una posibilidad de inducir falsa positividad debido a la administración de warfarina, la discriminación entre la falsa positividad debido a warfarina y la positividad de AL es difícil. Mientras tanto, el espécimen negativo en el ensayo de cribado de TTPA (espécimen 16) y el espécimen negativo en el ensayo de TVVRd (espécimen 19) no coinciden. Por otro lado, en el ensayo de mezcla, los resultados de tres ejemplos de catorce ejemplos eran positivos, y todos los tres ejemplos positivos eran también positivos en las Inversiones 1 y 2. Por lo tanto, se contempla que hay una alta posibilidad que entre los resultados del ensayo de TVVRd, al menos siete ejemplos de catorce ejemplos (en la tabla, indicados como "Positivo\*") puedan ser falsos positivos. Para los tres ejemplos de espécimen que se determinaron negativos en el ensayo de mezcla pero positivos en las Inversiones 1 y 2 (especímenes 11, 21 y 23), se midieron el anticuerpo anti- $\beta$ 2GPI (más adelante, a $\beta$ 2GPI) y el anticuerpo anti compuesto de fosfatidilserina-protrombina (más adelante, aPS/PT), los cuales se pueden considerar anticuerpos responsables para AL, y los especímenes 11 y 21 fueron positivos frente a ambos anticuerpos, mientras que el espécimen 23 fue positivo frente a aPS/PT. A partir de los anteriores resultados, se contempla que hay una alta posibilidad de que los resultados de estos tres ejemplos obtenidos en el ensayo de mezcla sean falso negativo, y en realidad sean AL positivos.
- En el grupo de no administrado con warfarina, los resultados de seis ejemplos de trece ejemplos eran positivos en todos los artículos, y los resultados de dos ejemplos eran negativos. Por lo tanto, en estos ocho ejemplos, la discriminación de positividad/negatividad era posible. Entre los cinco ejemplos restantes, se midieron a $\beta$ 2GPI y aPS/PT para el espécimen 30 que mostró positividad solamente en las Inversiones 1 y 2. Sin embargo, puesto que a $\beta$ 2GPI era positivo, se contempla que hay una posibilidad muy alta de que los resultados para TVVRd y el ensayo de mezcla sean falsos negativos, y en realidad sean AL positivos.

Tabla 6

| Determinación de especímenes administrados con warfarina/no administrados en los que se sospecha la presencia de AL |                 |                |       |       |           |                |                |               |      |           |                |               |      |           |                |                |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|-------|-------|-----------|----------------|----------------|---------------|------|-----------|----------------|---------------|------|-----------|----------------|----------------|--------|
| Artículo                                                                                                            | Cribado de TTPA |                |       | TVVRd |           |                | Ensayo mezcla  | Inventación 1 |      |           |                | Inventación 2 |      |           |                | aPT/GPI        | aPS/PT |
| Unidad                                                                                                              | seg             | Determi-nación | Seg   | Seg   | Rela-ción | Determi-nación | Determi-nación | Seg           | Seg  | Rela-ción | Determi-nación | Seg           | Seg  | Rela-ción | Determi-nación | Determi-nación |        |
| Valor de corte                                                                                                      | 48,4            |                |       |       | 1,25      |                |                |               |      | 1,30      |                |               |      | 1,35      |                |                |        |
| Especímen 11 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 143,0           | Positivo       | 220,4 | 82,5  | 2,67      | Positivo       | Negativo       | 102,5         | 76,4 | 0,75      | Positivo       | 80,5          | 66,4 | 0,82      | Positivo       | Positivo       |        |
| Especímen 12 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 117,5           | Positivo       | 126,4 | 55,4  | 2,28      | Positivo       | Positivo       | 82,8          | 81,2 | 0,98      | Positivo       | 70,7          | 72,7 | 1,03      | Positivo       |                |        |
| Especímen 13 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 71,9            | Positivo       | 100,4 | 60,3  | 1,67      | Positivo*      | Negativo       | 41,2          | 54,6 | 1,33      | Negativo       | 35,6          | 49,6 | 1,39      | Negativo       |                |        |
| Especímen 14 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 57,5            | Positivo       | 72,1  | 57,1  | 1,26      | Positivo*      | Negativo       | 33,0          | 51,8 | 1,57      | Negativo       | 30,4          | 49,4 | 1,63      | Negativo       |                |        |
| Especímen 15 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 49,4            | Positivo       | 60,7  | 45,9  | 1,32      | Positivo*      | Negativo       | 35,9          | 50,2 | 1,40      | Negativo       | 32,0          | 45,9 | 1,43      | Negativo       |                |        |
| Especímen 16 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 48,2            | Negativo       | 57,6  | 45,3  | 1,27      | Positivo*      | Negativo       | 36,8          | 52,8 | 1,43      | Negativo       | 33,1          | 50,3 | 1,52      | Negativo       |                |        |
| Especímen 17 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 87,0            | Positivo       | 99,2  | 49,4  | 2,01      | Positivo       | Positivo       | 46,9          | 55,1 | 1,17      | Positivo       | 42,9          | 51,6 | 1,20      | Positivo       |                |        |
| Especímen 18 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 52,0            | Positivo       | 97,8  | 58,8  | 1,66      | Positivo*      | Negativo       | 36,3          | 52,7 | 1,45      | Negativo       | 34,1          | 50,9 | 1,49      | Negativo       |                |        |
| Especímen 19 (adminis-trado con warfarina)                                                                          | 91,4            | Positivo       | 75,5  | 64,3  | 1,17      | Negativo       | Negativo       | 45,8          | 67,7 | 1,48      | Negativo       | 41,6          | 63,8 | 1,53      | Negativo       |                |        |

| Determinación de especímenes administrados con warfarina/no administrados en los que se sospecha la presencia de AL |                 |               |       |       |          |               |               |              |          |               |              |          |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|-------|-------|----------|---------------|---------------|--------------|----------|---------------|--------------|----------|---------------|
| Artículo                                                                                                            | Cribado de TTPA |               |       | TVVRd |          |               | Ensayo mezcla | Inventoría 1 |          |               | Inventoría 2 |          |               |
| Unidad                                                                                                              | seg             | Determinación | Seg   | Seg   | Relación | Determinación | Determinación | Seg          | Relación | Determinación | Seg          | Relación | Determinación |
| Espécimen 20 (administrado con warfarina)                                                                           | 88,9            | Positivo      | 60,7  | 47,7  | 1,27     | Positivo*     | Negativo      | 36,4         | 56,1     | 1,54          | 33,0         | 52,9     | Negativo      |
| Espécimen 21 (administrado con warfarina)                                                                           | 355,3           | Positivo      | 221,1 | 71,7  | 3,08     | Positivo      | Negativo      | 145,5        | 138,5    | 0,95          | 113,4        | 121,5    | Positivo      |
| Espécimen 22 (administrado con warfarina)                                                                           | 74,1            | Positivo      | 80,1  | 51,8  | 1,55     | Positivo      | Positivo      | 57,0         | 66,5     | 1,17          | 49,3         | 58,5     | Positivo      |
| Espécimen 23 (administrado con warfarina)                                                                           | 89,3            | Positivo      | 71,8  | 51,9  | 1,38     | Positivo      | Negativo      | 66,3         | 62,3     | 0,94          | 56,6         | 56,2     | Positivo      |
| Espécimen 24 (administrado con warfarina)                                                                           | 100,9           | Positivo      | 74,5  | 52,3  | 1,42     | Positivo*     | Negativo      | 46,0         | 70,6     | 1,53          | 42,3         | 63,1     | Negativo      |
| Espécimen 25 (no administrado con warfarina)                                                                        | 53,4            | Positivo      | 45,8  | 36,6  | 1,25     | Positivo      | Negativo      | 36,1         | 46,8     | 1,30          | 32,9         | 45,9     | Negativo      |
| Espécimen 26 (no administrado con warfarina)                                                                        | 78,6            | Positivo      | 92,2  | 40,5  | 2,28     | Positivo      | Positivo      | 52,8         | 61,6     | 1,17          | 49,3         | 58,8     | Negativo      |
| Espécimen 27 (no administrado con warfarina)                                                                        | 39,1            | Negativo      | 43,3  | 33,4  | 1,30     | Positivo      | -             | 26,9         | 38,6     | 1,43          | 25,8         | 37,6     | Negativo      |
| Espécimen 28 (no administrado con warfarina)                                                                        | 43,8            | Negativo      | 42,9  | 37,2  | 1,15     | Negativo      | -             | 40,3         | 53,7     | 1,33          | 35,9         | 49,5     | Negativo      |

| Determinación de especímenes administrados con warfarina/no administrados en los que se sospecha la presencia de AL |                 |                |      |       |           |                |                |                |      |              |           |                |              |      |           |                |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|------|-------|-----------|----------------|----------------|----------------|------|--------------|-----------|----------------|--------------|------|-----------|----------------|----------------|
| Artículo                                                                                                            | Cribado de TTPA |                |      | TVVRd |           |                | Ensayo mezcla  |                |      | Invencción 1 |           |                | Invencción 2 |      |           | aβ2GPI         | aPS/PT         |
| Unidad                                                                                                              | seg             | Determi-nación | Seg  | Seg   | Rela-ción | Determi-nación | Determi-nación | Determi-nación | Seg  | Seg          | Rela-ción | Determi-nación | Seg          | Seg  | Rela-ción | Determi-nación | Determi-nación |
| Espécimen 29 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 42,7            | Negativo       | 40,8 | 34,8  | 1,17      | Negativo       | -              | Negativo       | 34,9 | 49,3         | 1,41      | Negativo       | 32,4         | 46,7 | 1,44      | Negativo       |                |
| Espécimen 30 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 38,3            | Negativo       | 42,0 | 34,2  | 1,23      | Negativo       | -              | Negativo       | 22,9 | 28,9         | 1,26      | Positivo       | 21,8         | 28,4 | 1,30      | Positivo       | Negativ<br>o   |
| Espécimen 31 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 77,7            | Positivo       | 79,3 | 38,4  | 2,07      | Positivo       | Positivo       | Positivo       | 53,1 | 63,4         | 1,19      | Positivo       | 45,2         | 59,1 | 1,31      | Positivo       |                |
| Espécimen 32 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 90,5            | Positivo       | 78,2 | 38,9  | 2,01      | Positivo       | Positivo       | Positivo       | 63,0 | 77,0         | 1,22      | Positivo       | 54,8         | 71,3 | 1,30      | Positivo       |                |
| Espécimen 33 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 33,8            | Negativo       | 39,1 | 31,2  | 1,25      | Positivo       | -              | Positivo       | 23,4 | 33,8         | 1,44      | Negativo       | 22,5         | 33,0 | 1,47      | Negativo       |                |
| Espécimen 34 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 54,9            | Positivo       | 44,5 | 35,9  | 1,24      | Negativo       | Negativo       | Negativo       | 36,1 | 50,9         | 1,41      | Negativo       | 33,3         | 45,8 | 1,38      | Negativo       |                |
| Espécimen 35 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 85,7            | Positivo       | 82,0 | 42,3  | 1,94      | Positivo       | Positivo       | Positivo       | 50,8 | 57,9         | 1,14      | Negativo       | 44,2         | 52,7 | 1,19      | Negativo       |                |
| Espécimen 36 (no adminis-tración warfarina)                                                                         | 80,5            | Positivo       | 90,1 | 42,6  | 2,12      | Positivo       | Positivo       | Positivo       | 46,6 | 46,9         | 1,01      | Negativo       | 40,1         | 44,6 | 1,11      | Negativo       |                |

| Determinación de especímenes administrados con warfarina/no administrados en los que se sospecha la presencia de AL |                 |                |      |      |           |                |     |               |           |                |          |      |           |                |                |                |                |        |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|------|------|-----------|----------------|-----|---------------|-----------|----------------|----------|------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|--------|
| Artículo                                                                                                            | Cribado de TTPA |                |      |      | TVVRd     |                |     | Ensayo mezcla |           | Invencción 1   |          |      |           | Invencción 2   |                |                |                | aβ2GPI | aPS/PT |
| Unidad                                                                                                              | seg             | Determi-nación | Seg  | Seg  | Rela-ción | Determi-nación | Seg | Seg           | Rela-ción | Determi-nación | Seg      | Seg  | Rela-ción | Determi-nación | Determi-nación | Determi-nación | Determi-nación |        |        |
| Espécimen 37 (no administración warfarina)                                                                          | 80,0            | Positivo       | 88,9 | 43,7 | 2,03      | Positivo       |     | 50,3          | 54,4      | 1,08           | Negativo | 40,7 | 49,6      | 1,22           | Negativo       |                |                |        |        |

- 5 En el ensayo de cribado de TTPA y el ensayo de TVVRd, el sistema está afectado por anticoagulantes tales como heparina o warfarina, e induce la falsa positividad. Además, en el ensayo de mezcla, el sistema está afectado por warfarina o similares, y puede inducir falsa negatividad. El método de la presente invención puede conseguir la clara discriminación a partir de la deficiencia del factor de coagulación sin estar afectada por anticoagulantes tales como heparina o warfarina como en el caso del ensayo de cribado de TTPA y el ensayo de TVVRd, y presenta mayor sensibilidad y menos falsa negatividad que el ensayo de mezcla.

# REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar anticoagulantes lúpicos, comprendiendo el método las siguientes etapas (A), (B) y (C):

- 5 (A) añadir una composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea a cada una de una muestra de sangre y una muestra diluida de la muestra de sangre antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea;
- (B) medir los tiempos de coagulación sanguínea para las diversas muestras de la etapa (A); y
- 10 (C) comparar los tiempos de coagulación sanguínea para las diversas muestras obtenidas en la etapa (B),

donde cuando la relación  
(tiempo de coagulación de la muestra diluida) / (tiempo de coagulación de la muestra de sangre)  
es menor de un valor de corte calculado a partir de valores medidos de plasmas de personas sanas sin anormalidad  
de coagulación, la muestra de sangre se considera que es positiva para anticoagulante lúpico.

15 2. El método de detección según la reivindicación 1, donde los factores de coagulación sanguíneos son un tipo o dos o más tipos seleccionados de FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII.

20 3. El método de detección según la reivindicación 1 o 2, donde la muestra de sangre es sangre completa o plasma.

4. El método de detección según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea se añade a la muestra de sangre antes de la medición del tiempo de coagulación sanguínea.

25 5. El método de detección según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde un medio para medir el tiempo de coagulación sanguínea es el tiempo de tromboplastina activada o el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido.