

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 925**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2016 PCT/EP2016/060245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16180742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2016 E 16727311 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3295177**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de proteínas marcadoras para el diagnóstico y la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

**08.05.2015 EP 15166935**

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

**18.06.2019**

73 Titular/es:

**LEIBNIZ - INSTITUT FÜR ANALYTISCHE  
WISSENSCHAFTEN - ISAS - E.V. (100.0%)  
Bunsen-Kirchhoff-Strasse 11  
44139 Dortmund, DE**

72 Inventor/es:

**NESYT, FLORIAN;  
SICKMANN, ALBERT y  
ZAHEDI, RENÉ**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 716 925 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 identificación de proteínas marcadoras para el diagnóstico y la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea

5 La invención se refiere a un procedimiento para la identificación de proteínas marcadoras con el fin del diagnóstico y la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea.

10 Con el fin de una terapia adecuada se necesita un diagnóstico temprano y una diferenciación de alteraciones de la coagulación sanguínea junto con la necesidad de adoptar decisiones clínicas, en particular en la medicina de urgencias.

15 Mediante la acción de distintas sustancias (colágeno, trombina, inmunocomplejos, entre otras cosas), los trombocitos secretan factores de plaquetas almacenados en los gránulos (desgranulación), que causan sobre todo la activación del sistema endógeno de la coagulación sanguínea o hemostasia con configuración de un trombo. Sin embargo, la activación de los trombocitos puede estar alterada, en particular por motivos genético o patológicos. Esto, la mayoría de las veces, conlleva un mayor riesgo de graves efectos cardiovasculares o secundarios. Por tanto, es necesario determinar el grado de activación y la capacidad de activación (AuA) de trombocitos. Esto va asociado al grado de fosforilación de proteínas en trombocitos, tales como por ejemplo VASP, y está sometido a una actividad cinasa.

20 La determinación individual de AuA de trombocitos debe contribuir a posibilitar una clasificación más precisa de pacientes en grupos de riesgo, llevar a cabo una terapia personalizada adecuada (preparado, dosificación, duración, combinación) y, además, controlar la misma.

25 En el estado de la técnica se analizan las AuA de trombocitos en numerosos ensayos de función de trombocitos, activándose los trombocitos con agonistas o a través de fuerzas de cizalla y por ejemplo se determina la agregación para obtener una afirmación acerca de la capacidad de activación (sinónimo: inglés *response*) de trombocitos, tal como por ejemplo después del tratamiento con medicamentos tal como clopidogrel.

30 Estos ensayos funcionales comprenden sobre todo tres tipos principales: (i) ensayos basados en agregación, tales como por ejemplo LTA (inglés *light transmission aggregometry*), (ii) ensayos dependientes de la fuerza de cizalla y (iii) citometría de flujo. En general se demuestra que, a causa de la gran cantidad de distintos procedimientos y la escasa estandarización de las pruebas (así como de la preanalítica), por un lado la correlación entre distintas pruebas es escasa y, por otro lado, el poder informativo de las pruebas individuales con respecto a la predicción de respuesta a medicamentos y control de terapia en la práctica no es satisfactorio (Krisha et al., *Circulation* 2012, 1288-1303). También se discute el control terapéutico mediante tipado génico, de tal manera que actualmente se observan de forma crítica ambos procedimientos (Krisha et al., *Circulation* 2012, 1288-1303). El ensayo de VASP (sistema de prueba para la detección de la actividad de proteínas cinasas dependientes de ciclo-nucleótido, documento DE 100 29 210 A1), que determina el grado de fosforilación de la proteína VASP a través de anticuerpos fosfoespecíficos, actualmente es una de las pruebas de referencia para comprobar, a partir de pequeñas cantidades de sangre, el estado funcional/estado de activación de los trombocitos.

45 Parece ser que la medición de un único sustrato de cinasa o parámetro, tal como se usa en la mayoría de las pruebas, no es suficiente para determinar inequívocamente la AuA de trombocitos, sobre todo en el contexto de distintas vías de señalización de activación así como de inhibición, que se conocen en trombocitos.

50 Por tanto, en los procedimientos conocidos de diagnóstico es desventajoso que no se consigue suficientemente una detección temprana y completa de pacientes de riesgo y, por tanto, tampoco se produce de forma suficiente ni una estratificación del riesgo ni un control terapéutico. Un objetivo en el que se basa la invención consiste, por lo tanto, en desarrollar un procedimiento para la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea que posibilite una detección mejorada de pacientes de riesgo y otro objetivo para identificar proteínas marcadoras correspondientes.

55 Además, es desventajoso que en el estado de la técnica la mayoría de las veces no se consigue una sensibilidad y/o especificidad suficientes de las proteínas marcadoras.

60 Por tanto, es objetivo de la presente invención facilitar un procedimiento para la identificación de proteínas marcadoras con el fin del diagnóstico y la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea al igual que un procedimiento para la determinación del grado de activación y la capacidad de activación de trombocitos, que se lleva a cabo a partir de sangre de un paciente (sinónimo: sujeto de estudio).

El objetivo se resuelve mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, con las siguientes etapas:

- 65 i.) facilitación de sangre, sangre completa, suero sanguíneo o plasma sanguíneo que contiene trombocitos,  
ii.) división en alícuotas en al menos dos alícuotas,

iii.)

A. adición de un activador de trombocitos a al menos una primera alícuota y  
B. adición de un inhibidor de trombocitos a al menos una segunda alícuota y una o varias repeticiones de la respectiva adición y opcionalmente

5 C. adición de un activador de trombocitos y adición de un inhibidor de trombocitos a al menos una tercera alícuota o viceversa y, dado el caso, una o varias repeticiones de la respectiva adición,

iv.) lisis de las células, en particular trombocitos de iii.) A. B. y C. en la respectiva alícuota,

v.) extracción de las proteínas y digestión hasta dar péptidos mediante proteasas,

10 vi.) enriquecimiento y separación de los péptidos fosforilados,

vii.) análisis mediante espectrometría de masas cuantitativa y valoración,

seleccionándose los péptidos fosforilados que muestran al mismo tiempo una fosforilación aumentada o reducida de iii.) A en el tiempo y una fosforilación opuesta reducida o aumentada de iii.) B en el tiempo y opcionalmente  
15 muestran en comparación con péptidos fosforilados de iii.) C. una fosforilación reducida o aumentada.

(a continuación: procedimiento de acuerdo con la invención)

20 Las etapas iii.) a vii.) se pueden repetir de forma individual o conjunta con frecuencia discrecional. Las adiciones en iii.) C. se pueden producir por ejemplo con desplazamiento en el tiempo de 30 segundos. Además se pueden automatizar las etapas en su conjunto o individualmente.

25 Para el diagnóstico o la estratificación del riesgo únicamente es necesario que se identifiquen una o varias proteínas marcadoras que muestran relativamente entre sí de acuerdo con iii.) A y iii.) B una fosforilación diferente y, de hecho, opuesta y, de hecho, una fosforilación en cada caso aumentada (*reducida*) en iii.) A (presencia de un activador de trombocitos) y fosforilación reducida (*aumentada*) en iii.) B (presencia de un inhibidor de trombocitos) o viceversa (entre paréntesis, cursiva). En una muestra, de acuerdo con la invención en cada caso aproximadamente el 1 % de las proteínas totales muestra este comportamiento.

30 Con respecto a la etapa i.): se prefiere sangre en forma de sangre fresca de una muestra de un paciente o sujeto de estudio, por ejemplo por vía de la extracción de sangre (yema del dedo etc.).

35 Con respecto a la etapa ii.): la división en alícuotas (división de la muestra) se puede realizar en un número discrecional de alícuotas (tubos) (por ejemplo 360 o más).

En la etapa iii.) son activadores de trombocitos adecuados aquellos tales como ADP, colágeno, trombina, inmunocomplejos, inhibidores de la agregación de trombocitos, entre otras cosas, clopidogrel, prasugrel o ácido acetilsalicílico.

40 En la etapa iii.) son inhibidores de trombocitos adecuados aquellos tales como iloprost (análogo de prostaciclina) así como donadores de NO (monóxido de nitrógeno) tales como molsidomina o nitroprusiato.

45 La tercera alícuota iii.) C. sirve para asegurar adicionalmente los resultados y se puede recurrir a ella opcionalmente. Además se puede mantener opcionalmente una muestra ciega D. (alícuota de ii.) como control al no realizarse ninguna adición de activadores de trombocitos o inhibidores de trombocitos en la etapa iii.), realizándose sin embargo las etapas iv.) a vii.).

50 En la etapa iv.) se puede realizar la lisis con métodos discrecionales, en particular preferentemente con un tampón de lisis (2 % de SDS junto con inhibidores de fosfatasa), composición exacta según Beck et al., Blood 2014, 123(5):e1-e10. La lisis provoca una detención de la respuesta de señal celular o "enfriamiento" de la actividad de trombocitos.

55 En la etapa v.) se puede realizar la extracción con métodos discrecionales, en particular preferentemente con ayuda de una precipitación con etanol o preparación de muestra ayudada por filtro (Wisniewski et al., Nat Meth, 6 (2009) 359-362)). Se puede realizar una digestión proteolítica por ejemplo mediante tripsina (Dickhut et al., J Proteome Res 2014,6; 13(6): 2761-70), por lo que se obtienen péptidos con una longitud promedio de 14 aminoácidos que, mediante espectrometría de masas, se pueden detectar y cuantificar bien (intervalo preferente entre 7 y 35 aminoácidos).

60 Para el enriquecimiento de los péptidos obtenidos con el fin de la espectrometría de masas cuantitativa en la etapa vi.) se pueden usar los péptidos marcados o sin marcador. Un marcaje (*label*) adecuado, en particular un marcaje con isótopos se puede realizar por ejemplo mediante iTRAQ (Ross et al., Mol Cell Proteomics. 2004; 3: 1154-1169), ICPL (Kellermann J et al., Methods Mol Biol. 2012; 893: 143-53) o marcaje con dimetilo (Hsu et al., Anal Chem. 2003; 75: 6843-6852)). Naturalmente se pueden cuantificar las alícuotas así mismo de forma individual. La separación de los péptidos fosforilados, marcados o no marcados, se produce mediante dióxido de titanio (Dickhut et al., Methods Mol Biol. 2014; 1156: 417-30), como alternativa se pueden usar también otros procedimientos del enriquecimiento de fosfopéptidos, tales como ERLIC (Loroch et al, Anal Chem, 2015, 3; 87(3): 1596-604) o Ti4+-IMAC (De Graaf, Mol Cell Proteomics. 2014; 13(9): 2426-34).

Los péptidos fosforilados separados de este modo se suministran a una espectrometría de masas cuantitativa, preferentemente mediante LC-MS/MS.

En el marco de la presente invención se entiende por la expresión "espectrometría de masas cuantitativa" aquella en la que se aplica "MS/MS" (también: espectrometría de masas en tándem). En este caso, en el espectrómetro de masas se adquieren en primer lugar escaneos de MS1 que registran las relaciones de masa/carga (m/z) de los iones de péptido existentes y a continuación se fragmentan estos iones de péptido mediante transferencia de energía, por ejemplo mediante colisión con moléculas de gas inerte (N<sub>2</sub> o Ar). Después, los iones se descomponen de forma muy específica hasta dar otros iones (más ligeros) que se pueden leer en el escaneo de MS/MS.

Se pueden usar muchas combinaciones de analizadores, tales como triples cuadrupolos (QqQ), QqTOF (cuadrupolo-cuadrupolo-TOF), TOF-TOF al igual que TRAP-Orbitrap y otros espectrómetros de masas híbridos. Además de MS/MS clásico y MS<sup>3</sup> (Ting et al, Nat Meth, 8(11), 937-940 (2011)) se pueden usar MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) y PRM (*Parallel Reaction Monitoring*). Además se prefiere de acuerdo con la invención el acoplamiento con una cromatografía líquida (LC), en particular en forma de LC-MS/MS. En particular la LC-MS/MS permite una espectrometría de masas cuantitativa con resolución en el tiempo de los péptidos fosforilados de la etapa vi.).

A causa de las grandes cantidades de datos (10.000e espectros, 1000e péptidos fosforilados cuantificados) se tiene que realizar la evaluación de manera bioinformática. Para esto, los datos por un lado se evalúan cualitativamente para identificar las secuencias peptídicas detectadas (es decir, determinar la secuencia de aminoácidos y asignar a proteína original, localizar el sitio de fosforilación dentro de la secuencia) y, por otro lado, cuantitativamente (lectura de las intensidades de señal en el espectrómetro de masas como medida de la cantidad de péptido). La identificación se realiza con ayuda de algoritmos de búsqueda tales como Mascot (Perkins DN et al., Electrophoresis. 1999; 20: 3551), la localización del sitio de fosforilación con algoritmos tales como phosphoRS (Taus et al., J Proteome Res. 2011; 10(12): 5354-62.) En este caso se cotejan las informaciones de los escaneos de Ms y MS/MS con las informaciones de secuencia de bases de datos de secuencia proteica (por ejemplo disponibles en [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). La cuantificación se realiza dependiendo del procedimiento usado finalmente. En el procedimiento dependiente de ion indicador (ITRAQ, TMT) se usan las señales indicadoras generadas a causa de los marcadores en el espectro MS/MS como medida de las cantidades relativas del péptido en las diferentes muestras (figura 1). En procedimientos en marcaje no isobáricos (ICPL, dimetilo) así como la cuantificación sin marcador se produce la lectura de la información cuantitativa a nivel de los escaneos de MS (figura 1). Las señales se transforman de manera bioinformática en valores de intensidad (por ejemplo con ayuda del software Proteome Discoverer de Thermo Scientific) y se pueden cuantificar así los cambios entre las muestras.

La expresión de acuerdo con la invención "alteraciones de la coagulación sanguínea" comprende todos los procedimientos y procesos que en particular se basan en una hemostasia no intacta y conducen a una coagulación sanguínea reducida o aumentada. En particular en intervenciones quirúrgicas, tales alteraciones de la coagulación sanguínea pueden conducir a complicaciones con riesgo para la vida. "Alteraciones de la coagulación sanguínea" comprende de acuerdo con la invención enfermedades y estados así como enfermedades secundarias, tales como trombosis, ictus, infarto de miocardio, alteraciones de la perfusión así como enfermedades cardiovasculares. Todas las indicaciones mencionadas se describen además por ejemplo en Pschyrembel, De Gruyter, 266ª edición, Berlín 2015.

La expresión "estratificación del riesgo" comprende de acuerdo con la invención el hallazgo de pacientes, en particular pacientes de urgencias y pacientes de riesgo, con el peor pronóstico, con el fin de un diagnóstico y una terapia/tratamiento más intensivos de alteraciones de la coagulación sanguínea y enfermedades relacionadas al igual que enfermedades secundarias, en particular trombosis, ictus, infarto de miocardio, alteraciones de la perfusión, enfermedades cardiovasculares, con el fin de posibilitar una evolución lo más favorable posible de estas enfermedades. Una estratificación del riesgo de acuerdo con la invención permite por consiguiente un procedimiento eficaz de tratamiento que puede desembocar por ejemplo en un control terapéutico específico.

Por tanto, la invención se refiere así mismo a la identificación de pacientes con riesgo aumentado y/o un pronóstico desfavorable de alteraciones de la coagulación sanguínea y, de hecho, en pacientes sintomáticos y/o asintomáticos, en particular pacientes de urgencias.

De forma particularmente ventajosa, en particular en casos de la medicina de urgencias y/o intensiva mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se puede realizar una estratificación segura. El procedimiento de acuerdo con la invención posibilita por tanto decisiones clínicas que conducen a un éxito terapéutico rápido y a evitar casos de mortalidad. Tales decisiones clínicas comprenden así mismo el tratamiento posterior mediante medicamentos para el tratamiento o la terapia de alteraciones de la coagulación sanguínea, en particular de inhibidores de agregación de trombocitos (TAH), tales como abciximab, ácido acetilsalicílico, una combinación de ácido acetilsalicílico y dipiridamol, clopidogrel, eptifibatida, ilomedina, prasugrel, ticagrelor, ticlopidina, tirofiban.

Por tanto, la invención se refiere así mismo a un procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación del riesgo de pacientes de alteraciones de la coagulación sanguínea para la toma de decisiones clínicas, tales como tratamiento y terapia posterior mediante medicamentos, preferentemente en medicina intensiva o medicina de urgencias crítica en cuanto al tiempo, inclusive la decisión de hospitalización del paciente.

En otra forma de realización preferente, por tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención se refiere al control terapéutico de alteraciones de la coagulación sanguínea.

5 En otra forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención se realiza el mismo para el diagnóstico y/o la estratificación del riesgo para el pronóstico, para la detección temprana de diagnóstico diferencial y detección, para la valoración del grado de gravedad y para la valoración de la evolución de acompañamiento terapéutico.

10 En otra forma de realización preferente, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico temprano o diferencial o el pronóstico de alteraciones de la coagulación sanguínea en o de un paciente que se va a examinar.

15 En una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención se extrae del paciente que se va a examinar sangre, opcionalmente sangre completa o suero o plasma que se puede obtener y el diagnóstico se realiza *in vitro/ex vivo*, es decir, fuera del cuerpo humano o animal.

20 A causa de la determinación de los péptidos fosforilados de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención se consigue una alta sensibilidad y especificidad (véase ejemplos y figuras) y mediante la cantidad presente de proteínas fosforiladas correspondientes en al menos una muestra del paciente de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede realizar el diagnóstico o la estratificación del riesgo.

Ejemplos y figuras:

25 Los siguientes ejemplos y figuras sirven para explicar la invención sin limitar la misma.

30 En primer lugar se aíslan después de la extracción de sangre fresca trombocitos mediante centrifugación diferencial (Beck et al., Blood 2014, 123(5):e1-e10). La muestra se divide a continuación en alícuotas, de las cuales (i) una sirve de control no tratado, mientras que (ii-iv) tres se estimulan con un agonista activador tal como ADP o trombina durante 10 s, 30 s y 60 s o (v-vii) tres se inhiben, por ejemplo, mediante adición de iloprost o NONOato de dietilamina, así mismo durante 10 s, 30 s, 60 s, (viii) una muestra se activa durante 30 s y a continuación se inhibe durante 30 s.

35 Para la búsqueda sistemática de proteínas marcadoras adecuadas se deben seleccionar distintas concentraciones, activadores/inhibidores así como momentos. Cada muestra se lisa con rapidez directamente después de la estimulación con un tampón de lisis (por ejemplo 2 % de SDS, cóctel de inhibidor de fosfatasa). Después de realizarse la lisis se extraen las proteínas mediante precipitación con etanol o preparación de muestra ayudada por filtro (Wisniewski et al., Nat Meth, 6 (2009) 359-362). Se produce después una digestión proteolítica mediante tripsina (Dickhut et al., J Proteome Res 2014, 6; 13 (6): 2761-70)

40 Las muestras peptídicas generadas se marcan ahora químicamente mediante marcaje con isótopo estable (por ejemplo iTRAQ Label de AB Sciex) y a continuación se combinan o se tratan individualmente para un denominado análisis sin marcador (inglés *label free*) y se analizan. Para separar los péptidos fosforilados importantes para el análisis del gran exceso en péptidos no fosforilados y hacerlos accesibles a la espectrometría de masas se enriquecen péptidos fosforilados mediante dióxido de titanio (Dickhut et al., Methods Mol Biol. 2014; 1156: 417-30). A continuación se analizan las muestras de fosfopéptidos en solitario (análisis sin marcaje) o la muestra combinada (iTRAQ) mediante nano-LC-MS/MS (véase la Figura 1).

Figura 1: desarrollo experimental después del aislamiento y la estimulación (activación) de los trombocitos.

50 Los péptidos fosforilados y, por consiguiente, la respuesta de señal de los trombocitos a la activación o inhibición se muestra finalmente en la cuantificación (abajo a la izquierda: cuantificación mediante iones indicadores de los marcadores químicos; abajo a la derecha: cuantificación "sin marcador" mediante la intensidad de señal del fosfopéptido en las respectivas muestras). (A) Ejemplo ilustrativo de una potencial nueva proteína marcadora. El aumento de las señales ADP 1, ADP2 y ADP3 en comparación con el control muestra un aumento de la fosforilación después de la estimulación de ADP, mientras que las señales Ilo 1, Ilo 2, Ilo 3 indican una reducción de la fosforilación después de la inhibición. El aumento por estimulación de ADP se puede compensar finalmente mediante adición de iloprost (ADP/Ilo). Básicamente es posible también el caso opuesto, en el que ADP conduce a una reducción e iloprost a un aumento.

60 Figura 2: explicación del procedimiento de acuerdo con la invención.

65 (i) Los trombocitos asumen un papel clave en el proceso fisiológico de la hemostasia. Es decir, cuando un vaso sanguíneo está lesionado, los trombocitos reconocen esto, por ello "se activan", se agregan y forman así un trombo estable que cierra la herida, por lo tanto, detiene la pérdida de sangre y evita también la penetración de patógenos y sustancias extrañas. Este proceso se desarrolla en el intervalo de pocos segundos a minutos. En el torrente sanguíneo están presentes, entre otras cosas, compuestos de efecto inhibidor que han de evitar que esta activación de trombocitos tenga lugar de forma espontánea. Si este sistema sensible está alterado se pueden

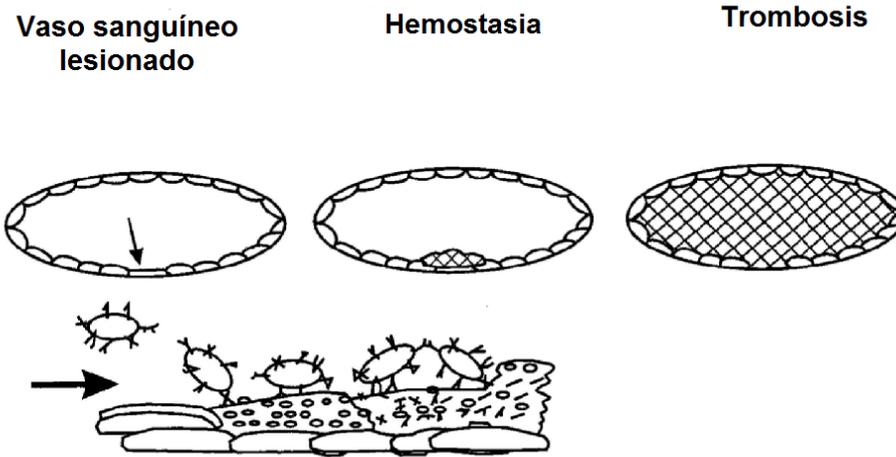
producir por ejemplo trombosis, que cierran los vasos sanguíneos, con ello interrumpen el suministro de sangre al tejido y finalmente pueden conducir a un infarto.

5 (ii) La activación de trombocitos se desarrolla a través de las denominadas cascadas de fosforilación. En este caso, los componentes activadores o inhibidores del sistema sanguíneo se unen a receptores de membrana y desencadenan por ello una “señalización de regulación a la baja”. Es decir, las enzimas unen de forma dirigida restos fosfato a través de enlaces covalentes a proteínas (quinasas) o retiran los mismos (fosfatasas). Los grupos fosfato conducen a un cambio de carga en la superficie de las proteínas y, por lo tanto, a un cambio de su estructura tridimensional. Esta última define a su vez (a) las proteínas que interaccionan entre sí o (b) la función y (c) la actividad que finalmente tiene la proteína. Por tanto, la fosforilación es un sistema reversible y finamente ajustado para la rápida regulación de procesos celulares.

15 (iii) Mediante espectrometría de masas (MS) cuantitativa se pueden medir ahora cambios de la fosforilación de proteína de cientos a miles de proteínas. Para esto se aíslan trombocitos de donantes sanos preferentemente de sangre fresca, las aproximadamente 4000-5000 proteínas existentes se purifican y se escinden proteolíticamente en fragmentos de menor tamaño, los denominados péptidos. Estos péptidos se someten a un enriquecimiento para que se suministren al análisis solo aquellos que contienen uno o varios restos fosfato. Finalmente, la MS cuantitativa se usa para detectar diferencias en la fosforilación después de la estimulación de trombocitos con compuestos activadores (ADP) o inhibidores (iloprost). Los datos cuantitativos con resolución en el tiempo se evalúan de manera bioinformática para obtener conocimientos acerca de la “red” (totalidad de las vías de señalización). (iv) Los datos de espectrometría de masas cuantitativa con resolución en el tiempo se usan para detectar evoluciones claramente diferentes (es decir, opuestas) de la fosforilación en determinadas proteínas. Incluso cuando no se conoce la función exacta de un sitio de fosforilación determinado en una proteína, las evoluciones opuestas indican un papel clave en el equilibrio (homeostasia) de los trombocitos. Un sitio de fosforilación que aumenta con la activación y disminuye con la inhibición y viceversa indica un papel clave en ambos procesos y, por tanto, representa un potencial candidato (diana) para fines de diagnóstico así como terapéuticos y se puede recurrir al mismo para la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea al igual que para la determinación del grado de activación y la capacidad de activación de trombocitos.

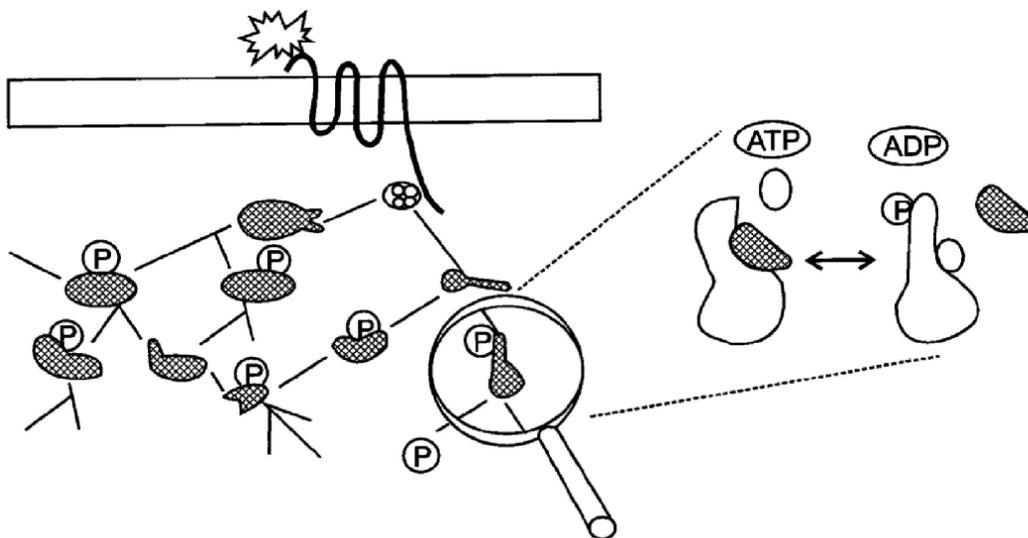
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la identificación de proteínas marcadoras para el diagnóstico y la estratificación del riesgo de alteraciones de la coagulación sanguínea con las siguientes etapas:
- i.) facilitación de sangre, sangre completa, suero sanguíneo o plasma sanguíneo que contiene trombocitos,
  - ii.) división en alícuotas en al menos dos alícuotas,
  - iii.)
- 10 A. adición de un activador de trombocitos a al menos una primera alícuota y  
B. adición de un inhibidor de trombocitos a al menos una segunda alícuota y una o varias repeticiones de la respectiva adición y opcionalmente  
C. adición de un activador de trombocitos y adición de un inhibidor de trombocitos a al menos una tercera alícuota o viceversa y, dado el caso, una o varias repeticiones de la respectiva adición,
- 15 iv.) lisis de las células, en particular trombocitos de iii.) A. B. y C. en la respectiva alícuota,  
v.) extracción de las proteínas y digestión hasta dar péptidos mediante proteasas,  
vi.) enriquecimiento y separación de los péptidos fosforilados,  
vii.) análisis mediante espectrometría de masas cuantitativa y valoración,
- 20 seleccionándose los péptidos fosforilados que muestran al mismo tiempo una fosforilación aumentada o reducida de iii.) A en el tiempo y una fosforilación opuesta reducida o aumentada de iii.) B en el tiempo y opcionalmente muestran en comparación con péptidos fosforilados de iii.) C. una fosforilación reducida o aumentada.
- 25 2. Procedimiento para la determinación del grado de activación y la capacidad de activación de trombocitos, caracterizado porque se lleva a cabo un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 a partir de la sangre de un paciente.
- 30 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes para la identificación, el diagnóstico y la estratificación del riesgo de pacientes con un riesgo elevado y/o un pronóstico desfavorable de alteraciones de la coagulación sanguínea y enfermedades (secundarias), en particular trombosis, ictus, infarto de miocardio, alteraciones de la perfusión así como enfermedades cardiovasculares.
- 35 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, siendo el paciente un paciente sintomático y/o asintomático, en particular un paciente de urgencias.
- 40 5. Procedimiento para la identificación, el diagnóstico y la estratificación del riesgo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, para el control terapéutico de alteraciones de la coagulación sanguínea y enfermedades (secundarias), en particular trombosis, ictus, infarto de miocardio, alteraciones de la perfusión así como enfermedades cardiovasculares, en particular en la medicina intensiva o medicina de urgencias.
- 45 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes para la toma de decisiones clínicas, en particular tratamientos y terapias posteriores mediante medicamentos, en particular en la medicina intensiva o medicina de urgencias, inclusive la decisión de hospitalización del paciente.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes para el pronóstico, para la detección temprana de diagnóstico diferencial y detección, para la valoración del grado de gravedad y para la valoración de la evolución de acompañamiento terapéutico.



**Fig. 1.1**

Cascada de fosforilación después de la simulación de un receptor de membrana



**Fig. 1.2**



Proteínas/sitios de fosforilación candidato: respuesta opuesta después de activación e inhibición

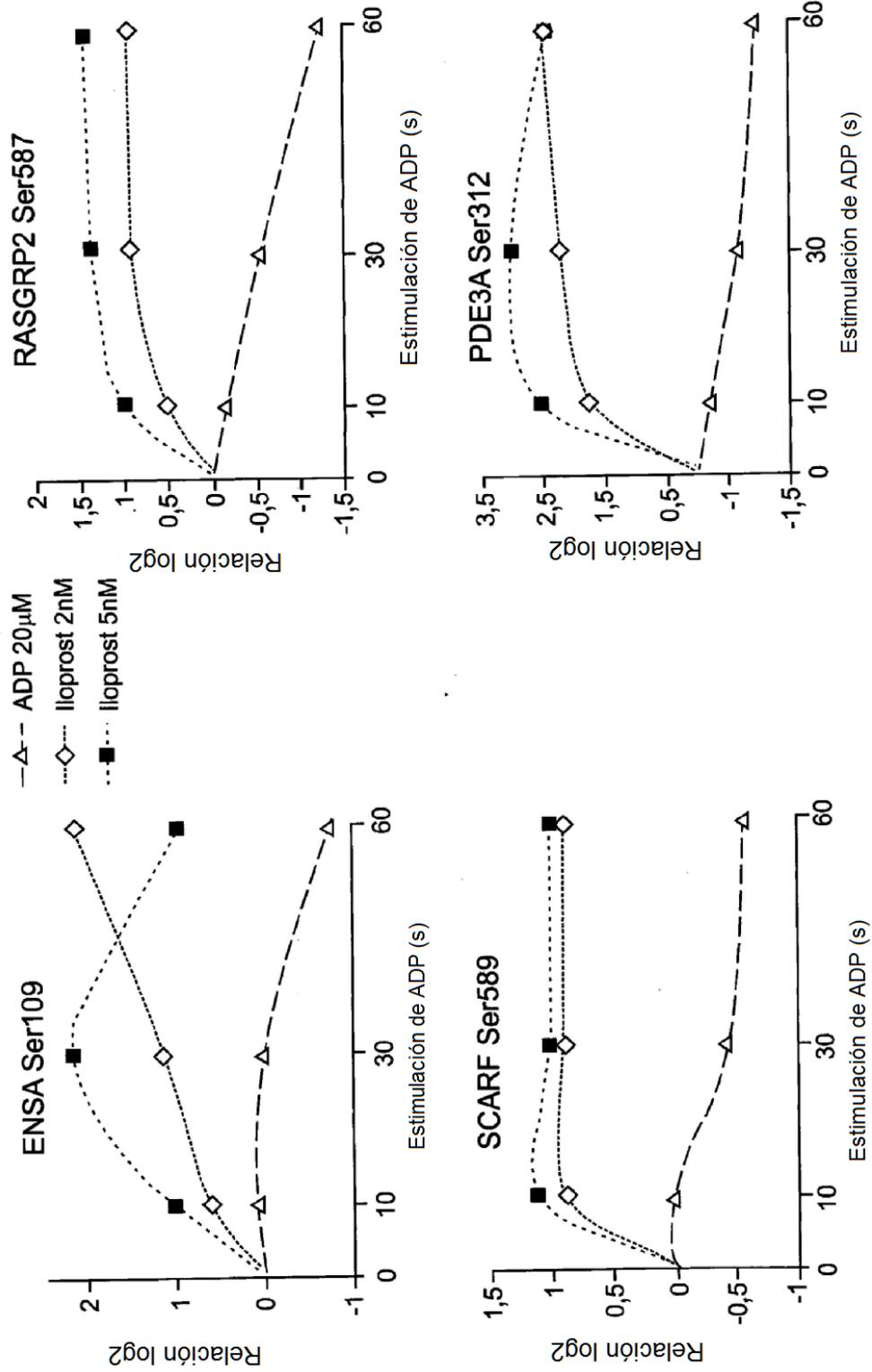
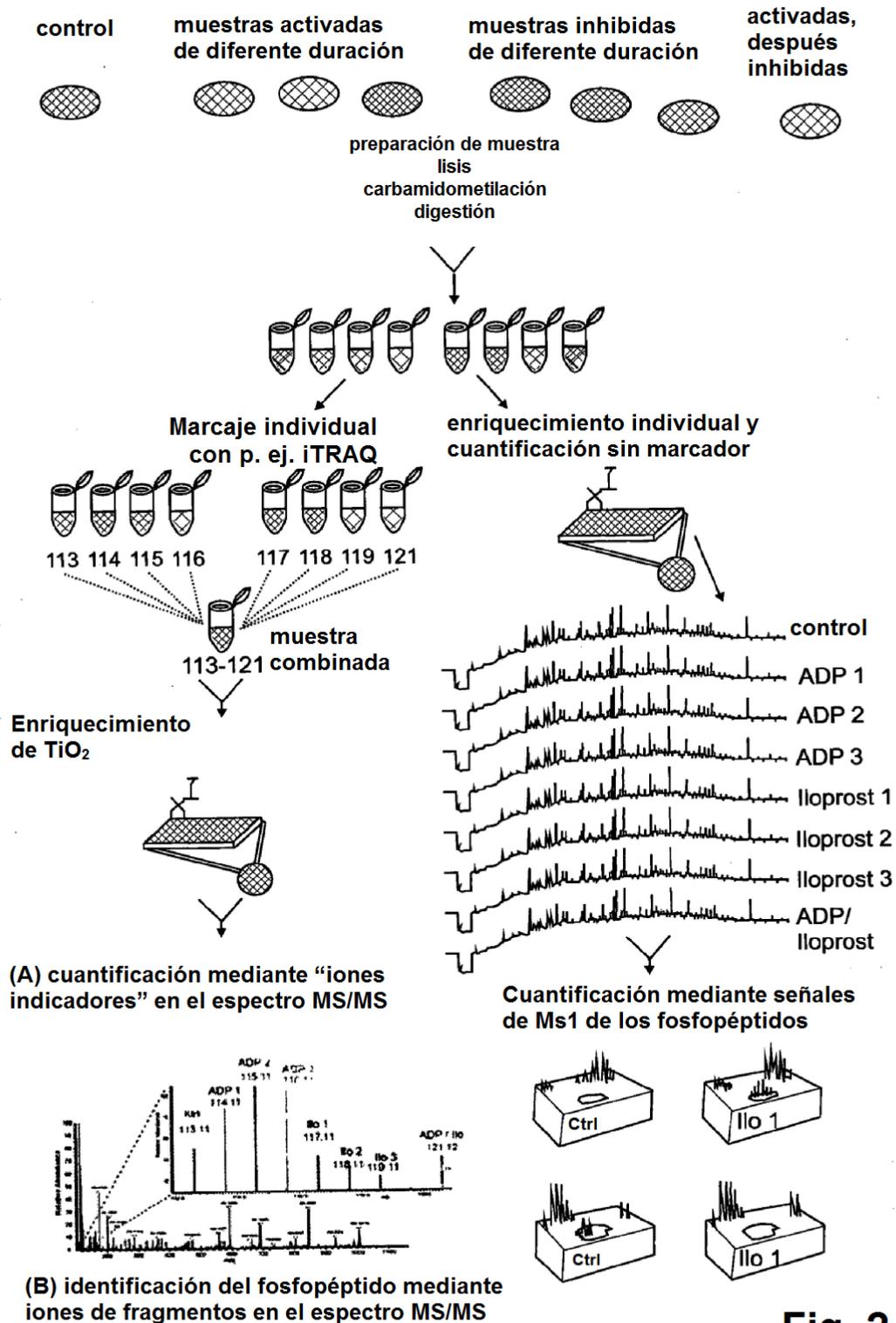


Fig. 1.4



**Fig. 2**