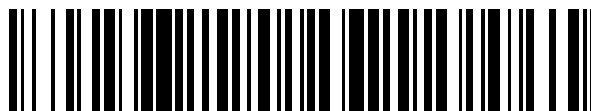


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 426**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014 PCT/EP2014/063520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014 E 14732895 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3014282**

54 Título: **Medios y procedimientos para calibración universal de pruebas anti-factor Xa**

30 Prioridad:

28.06.2013 EP 13174242

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

24.09.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacher Strasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ACKERMANN, FRIEDRICH y

CALATZIS, ANDREAS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 725 426 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

Medios y procedimientos para calibración universal de pruebas anti-factor Xa

- 5 La presente invención se refiere a medios y procedimientos de diagnóstico en el campo de las pruebas de coagulación. En particular, se refiere a un procedimiento para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende medir una primera actividad de factor Xa en una muestra de prueba de fluido corporal de dicho sujeto, medir una segunda actividad de factor Xa en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante, calcular un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba basada en la primera y la segunda actividades del factor Xa medidas y comparar dicho parámetro para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes. Además, se proporciona un código de programa informático que asiste al procedimiento, así como un sistema para llevar a cabo dicho procedimiento, así como un equipo.
- 10
- 15 Cualquier organismo más grande tiene un sistema de circulación sanguínea, que lleva oxígeno y nutrientes a los diferentes órganos, y elimina dióxido de carbono y desechos. Sin embargo, para que el sistema de circulación de la sangre funcione, las lesiones en los vasos sanguíneos deben cerrarse con rapidez y eficacia. Esta función la cumple el sistema de coagulación de la sangre, que es un mecanismo complejo que permite que la sangre forme agregados plaquetarios y geles de fibrina, que pueden cerrar las lesiones vasculares.
- 20
- 25 Sin embargo, la coagulación de la sangre no solo puede provocar hemostasia, es decir, el cierre de las lesiones en los vasos sanguíneos, sino también trombosis y embolia, es decir, el cierre de los vasos sanguíneos por coágulos de sangre. La trombosis y la embolia pueden tener muchas manifestaciones, tal como trombosis venosa en las piernas, embolia pulmonar, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular. El sistema de coagulación de la sangre es, por lo tanto, un proceso importante para salvar vidas, que, sin embargo, también puede causar complicaciones graves e incluso la muerte del paciente, si la coagulación de la sangre cierra los vasos sanguíneos vitales.
- 30
- 35 Un mecanismo implicado en el sistema de coagulación de la sangre es la cascada de los factores de coagulación, que es una serie de serina proteasas, que se activan en serie y finalmente dan lugar a la formación de trombina, la enzima central del sistema de coagulación sanguínea. La trombina puede dividir el fibrinógeno en fibrina, que se desprende, polimeriza en fibras de fibrina, que forman un coágulo de fibrina. La trombina también activa cofactores, que aceleran su propia generación (factor V y factor VIII), activa el factor XIII, una transglutaminasa, que reticula y, por tanto, estabiliza el coágulo de fibrina, y la trombina también es un potente activador de las plaquetas de la sangre.
- 40
- 45 A medida que los individuos envejecen y también acelerados por factores de riesgo como la diabetes, la obesidad, el tabaquismo y factores genéticos de riesgo, aumenta el riesgo de episodios trombóticos. Por lo tanto, se han desarrollado fármacos que inhiben el sistema de coagulación, los llamados anticoagulantes. Una de las clases más exitosas de fármacos anticoagulantes son los inhibidores del factor Xa, una serina proteasa que activa la protrombina a trombina. La formación del factor Xa es la etapa que precede directamente a la activación de la trombina.
- 50
- 55 El factor Xa es inhibido por varios fármacos diferentes, tales como la heparina de bajo peso molecular, un pentasacárido, el rivaroxabán, el apixabán y la heparina no fraccionada. Estos medicamentos tienen diferentes estructuras, pesos moleculares y mecanismos, pero comparten el rasgo característico común de que todos dan lugar a la inhibición del factor Xa y, por lo tanto, a una reducción de la generación de trombina.
- 60
- 65 La mayoría de los fármacos dirigidos contra el factor Xa son, en general, muy seguros y no requieren una monitorización de rutina de su efecto en la aplicación clínica. Aun así, hay situaciones en las que es deseable la capacidad de medir la actividad de estos fármacos: Por ejemplo, cuando el médico tratante sospecha que el paciente podría no tomar su medicación de manera fiable y quiere controlar el nivel del fármaco, o si el paciente tiene una enfermedad que podría dar lugar a una acumulación del fármaco en la circulación y, por lo tanto, a complicaciones hemorrágicas, o en pacientes muy viejos, en niños o pacientes con obesidad importante, o en pacientes que experimentan complicaciones durante su tratamiento anticoagulante, es decir, hemorragia o trombosis, y los médicos quieren dilucidar el estado actual de la anticoagulación.
- Se usan comúnmente dos ensayos globales para medir la actividad de los factores de coagulación: El tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). En ambos ensayos, la cascada de coagulación se estimula en su inicio (por el factor tisular en el PT y por un activador de contacto en el aPTT) y después de una serie de reacciones enzimáticas se forma la trombina y la muestra se coagula. El tiempo transcurrido entre el inicio de la prueba y la coagulación de la muestra es el tiempo de coagulación, que es indicativo de la actividad de los factores de coagulación. Sin embargo, en ambos ensayos, la formación del factor Xa es solo una etapa de muchas y, por lo tanto, el aPTT y el PT tienen una baja sensibilidad para la mayoría de los inhibidores del factor Xa y una mala cuantificación de la actividad real del fármaco (véase, por ejemplo, el documento EP 1 734 369 A1).
- Se han desarrollado procedimientos más específicos para cuantificar la inhibición del factor Xa. Los ensayos para medir la inhibición del factor Xa también se denominan "pruebas anti-Xa" o "pruebas anti-factor Xa". Un rasgo

- característico común de estas pruebas anti-factor Xa es que se añade una muestra a dos reactivos: uno que contiene el factor Xa y otro que contiene un sustrato peptídico que se puede dividir por el factor Xa. A continuación, la conversión del sustrato peptídico por el factor Xa se registra en la solución de reacción. El sustrato peptídico comprende una secuencia de aminoácidos determinada que le permite su escisión por el factor Xa, por lo que la velocidad de conversión es proporcional a la actividad del factor Xa en la muestra. Cuando el factor Xa divide el sustrato, interviene una reacción de señal, que se mide con el analizador, que realiza la prueba anti-Xa. Normalmente, un grupo químico que proporciona un marcador detectable (tal como, por ejemplo, un cromógeno o un fluoróforo) se une covalentemente al sustrato peptídico. Cuando se usa dicho sustrato peptídico cromogénico, se libera un grupo que cambia el color de la solución, que se puede medir fotométricamente. Cuando se usa un sustrato fluorogénico, se libera un grupo fluorescente y, cuando la reacción se mide electroquímicamente, la división del sustrato por el factor Xa da como resultado el cambio de la estructura iónica de la solución de reacción. El rasgo característico común de los diferentes sustratos es que en todos los casos se produce una reacción de señal en la muestra, que es proporcional a la concentración del factor Xa en la muestra y que es registrada por el analizador.
- Entre la adición del reactivo que contiene el factor Xa a la muestra y la adición del reactivo que contiene el sustrato puede haber una etapa de incubación, para permitir que el inhibidor del factor Xa en la muestra inhiba el factor Xa. Sin embargo, también hay ensayos sin dicha etapa de incubación. Opcionalmente, también se pueden añadir otras sustancias que influyen en la especificidad del ensayo, tal como sulfato de dextrano o antitrombina.
- El resultado del ensayo es entonces el cambio de la absorbancia, o la tasa de cambio de la absorbancia (o fluorescencia o cualquier otra reacción de señal usada). Por simplicidad, se supone que la reacción de señal es el cambio en la absorbancia expresada en mE (mili unidades de extinción).
- Como es sabido en la técnica normalmente, usando esta absorbancia, la concentración de anticoagulante se calculaba usando una curva de calibración. Este procedimiento se desarrolló cuando solo se aplicaban terapéuticamente 2 clases de inhibidores del factor Xa, a saber, heparina no fraccionada (UFH) y heparina de bajo peso molecular (LMWH). Típicamente, se realizaba una curva de calibración separada con calibradores, que contienen dosis crecientes de LMWH o UFH, y después de la medición de estos calibradores, el analizador determina la curva de calibración para calcular la concentración de anticoagulante a partir de los valores de absorbancia determinados con las muestras de plasma.
- Mientras tanto, se han introducido varios inhibidores adicionales del factor Xa en la práctica clínica y se encuentran disponibles calibradores así como controles para, por ejemplo, rivaroxabán, un pentasacárido, danaparoid.
- En cualquier hospital de mayor tamaño, actualmente, se usan simultáneamente muchos anticoagulantes diferentes. Algunos pacientes pueden recibir HBPM como profilaxis de la trombosis venosa profunda (TVP) durante la hospitalización, otros pueden recibir rivaroxabán como profilaxis de un accidente cerebrovascular causado por la fibrilación auricular, otros pacientes reciben pentasacáridos para la prevención de la TVP en la artroplastia de cadera y los pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI) pueden recibir tratamiento con heparina no fraccionada.
- El proceso clínico, típicamente, es el siguiente: El personal auxiliar por ejemplo, un analista, personal de enfermería o uno de los médicos más jóvenes) prepara los tubos de extracción de sangre para la extracción de sangre y cumplimenta los formularios de pedido respectivos que especifican qué ensayos se deben realizar. La sangre se recoge y se transfiere al laboratorio junto con el formulario de pedido. Si se ha ordenado una prueba para LMWH, UFH, rivaroxabán o apixabán, se realiza una prueba anti-factor Xa y la concentración del anticoagulante se calcula en función de la curva de calibración correspondiente. Esta concentración se transfiere a continuación a los médicos tratantes por medio del sistema de información de laboratorio (LIS), que normalmente está disponible a través de intranet, o por fax, carta u otros medios de información.
- Sin embargo, este procedimiento para ordenar los ensayos, la calibración y la expresión del resultado tiene varios inconvenientes. Estas limitaciones afectan a la eficiencia del proceso, pero también imponen riesgos médicos.
- Por ejemplo, la necesidad de usar varios conjuntos de calibradores y controles para un solo procedimiento de diagnóstico (la prueba anti-factor Xa) es engorrosa, costosa y añade complejidad en el análisis del laboratorio. Si cabe imaginar que cada prueba de laboratorio requiere diferentes calibraciones, controles y procedimientos de prueba de competencia, cabe imaginar que esto añadiría una gran carga al esfuerzo que supone el análisis de laboratorio y también a los costes de un laboratorio.
- Además, existen riesgos, que se pueden resaltar mediante el siguiente ejemplo: Como se mencionó anteriormente, los formularios de pedido para las pruebas de sangre normalmente no los cumplimentan los propios médicos tratantes, sino personal auxiliar que tiene un nivel de educación médica o experiencia menor (personal de enfermería, analistas, médicos jóvenes). Si ahora, sin querer, el personal auxiliar ordena una prueba de "LMWH", mientras el paciente recibe rivaroxabán, el laboratorio informará de una concentración de LMWH, aunque el paciente podría no haber sido tratado nunca con este fármaco. Esto significa que la expresión del resultado de laboratorio es más específica que el propio procedimiento analítico. Lo que se mide es la inhibición del factor Xa. Sin embargo, de lo que se informa es de la concentración de un fármaco en particular. En otra situación, cabe asumir que un médico que evalúa los valores de

laboratorio de un paciente vería una caída en el recuento de plaquetas y, al mismo tiempo, una concentración determinada de LMWH. Por lo tanto, dicho médico podría interpretar erróneamente este resultado como una trombocitopenia inducida por heparina. El problema no es solo que una orden incorrecta se propaga a través del proceso, sino que la información incorrecta al principio se evalúa posteriormente a través de la cadena. Si un miembro del personal de enfermería le ha dicho al médico que el paciente había recibido LMWH, el médico podría verificar esta información. Sin embargo, si el médico recibe una "concentración de LMWH" en un informe oficial de su laboratorio, con la firma del personal responsable del laboratorio, supondrá que esta información es correcta.

Por lo tanto, el procedimiento de diagnóstico actual implica una selección muy temprana del procedimiento de calibración que se aplicará mucho más adelante en el proceso de diagnóstico, selecciones erróneas del fármaco que se va a calibrar se propagan a lo largo de todo el proceso de diagnóstico y se evalúan posteriormente. El procedimiento de diagnóstico que implica una etapa de medición genérica (es decir, inhibición del factor Xa) y una etapa de calibración (contra el anticoagulante respectivo) no es transparente para el usuario. El procedimiento de calibración es rígido, es decir, una vez que se ha informado del resultado, no es posible cambiar la calibración aun cuando se haya seleccionado un fármaco incorrecto anteriormente en el proceso (Favaloro 2011, Pathology, Dec;43(7):682-92; Tripodi 2013, Clin Chem, Feb;59(2):353-62; y Gehrie 2012, Am J Hematol., Feb;87(2):194-6).

El problema técnico subyacente a la presente invención puede interpretarse como la provisión de medios y procedimientos para satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones y en el presente documento.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende:

- (a) medir una primera actividad del factor Xa en una muestra de prueba de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) medir una segunda actividad del factor Xa en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante;
- (c) calcular un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba en base a la primera y la segunda actividades del factor Xa medidas; y
- (d) comparar dicho parámetro para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes para determinar la actividad anticoagulante.

El procedimiento de la presente invención, preferentemente, es un procedimiento *ex vivo*, es decir, se lleva a cabo *in vitro* con una muestra aislada de un sujeto. Además, puede comprender etapas adicionales de las mencionadas explícitamente con anterioridad. Por ejemplo, otras etapas pueden estar relacionadas con pretratamientos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el procedimiento. El procedimiento se puede llevar a cabo manualmente o asistido por automatización. Las etapas (a) y/o (b) pueden estar asistidas en su totalidad o en parte por automatización, por ejemplo, mediante un equipo robótico y sensitivo adecuado para la determinación en la etapa (a) y/o (b), y un algoritmo de cálculo o comparación implementado por ordenador en un dispositivo de procesamiento de datos en las etapas (c) y (d), respectivamente. Preferentemente, al menos las etapas c) y d) se llevan a cabo mediante un algoritmo implementado por ordenador.

El término "determinar la actividad anticoagulante" como se usa de acuerdo con la presente invención se refiere a la determinación cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa de la presencia de actividad anticoagulante en una muestra de un sujeto. La actividad anticoagulante se refiere a la capacidad de un compuesto para prevenir o inhibir la coagulación de la sangre como se describe en otra parte del presente documento con más detalle. El procedimiento de la presente invención permite determinar cuantitativa o semicuantitativamente la cantidad de actividad de anticoagulación presente en una muestra. Además, al comparar un parámetro derivado de la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de la actividad de anticoagulación esperada para anticoagulantes dados, también se puede identificar el anticoagulante que provoca la actividad anticoagulante en una muestra, es decir, la actividad anticoagulante se determina (o identifica) cualitativamente.

El término "anticoagulante" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que puede prevenir o inhibir la coagulación de la sangre. La coagulación de la sangre es un proceso bien conocido, en el que la sangre forma coágulos de fibrina para evitar la pérdida de sangre, por ejemplo, de vasos dañados. La coagulación de la sangre es un proceso que implica a una pluralidad de enzimas y sustancias auxiliares. Para la formación del coágulo de fibrina, el fibrinógeno se convierte en fibrina que posteriormente se reticula. Tanto el fibrinógeno como la enzima que confiere la reticulación, el factor XIIIa, son activados enzimáticamente por la proteasa trombina. La trombina en sí misma es activada por el factor Xa, que a su vez es activado por un complejo de factor tisular/factor VIIa o un complejo de factor IXa/factor VIIIa. Los factores VIIa, VIIIa y IXa también se activan a su vez a partir de sus precursores durante el proceso de coagulación de la sangre. Como las enzimas se activan unas a otras en un orden jerárquico, la totalidad de las enzimas también se denomina a veces cascada de coagulación. Se han descrito diversos compuestos como anticoagulantes que afectan a una o más enzimas o sustancias auxiliares de la cascada de coagulación. Las

cumarinas, por ejemplo, son antagonistas de la vitamina K de origen vegetal que disminuyen en el organismo la forma activa de la vitamina K que se requiere como sustancia auxiliar para la actividad de la trombina y los factores VII, IX y X. Las cumarinas típicas incluyen warfarina, acenocumarol, fenprocumon, atromentina, brodifacoum o fenindiona. Las heparinas son glucosaminoglicanos altamente sulfatados y se asemejan a otra clase de anticoagulantes naturales.

5 Activan la antiprotrombina III que bloquea la actividad de la trombina y otras enzimas de la cascada de coagulación, incluyendo el factor Xa y, de este modo, inhiben la formación de coágulos de fibrina. Típicamente, se usa heparina de bajo peso molecular (LMWH) o heparina no fraccionada (UFH) como heparina en el tratamiento de anticoagulación. También se usan los heparanoides en el tratamiento de anticoagulación como danaparoid (también llamado Orgaran). Diversos fármacos, como el rivaroxabán o el apixabán, son inhibidores directos del factor Xa. Otros inhibidores del factor Xa incluyen pentasacáridos tales como fondaparinux o idraparinux. Por lo tanto, un primer anticoagulante puede ser un anticoagulante como se define anteriormente. Lo mismo se aplica para el segundo anticoagulante de acuerdo con la invención. Preferentemente, sin embargo, dicho primer y dicho segundo anticoagulantes son diferentes, es decir, un compuesto anticoagulante químicamente diferente. Preferentemente, dicho primer y/o segundo anticoagulante se seleccionan del grupo que consiste en: LMWH, UFH, danaparoid, rivaroxabán, un pentasacárido y apixabán.

El término "muestra de prueba de fluido corporal", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de fluido corporal que comprende actividad de anticoagulación. Preferentemente, dicha muestra de prueba de fluido corporal es una muestra de orina, una muestra de sangre completa o una muestra de plasma sanguíneo. También se incluyen muestras de fluido corporal pretratadas, tales como muestras de plasma citratadas.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un animal que tiene un sistema de coagulación y, preferentemente, a un mamífero y, más preferentemente, a un ser humano.

25 El término "muestra de calibrador" se refiere a una muestra que comprende actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante que se usa en el procedimiento de la presente invención para propósitos de calibración. Las muestras de calibrador se pueden obtener haciendo diluciones definidas de una muestra de calibrador o una muestra madre con actividad de anticoagulación predefinida. Típicamente, la actividad de anticoagulación presente en una muestra de calibrador es conocida, ya que ha sido predefinida o se puede calcular sin más dilución. Preferentemente, una muestra de calibrador de acuerdo con la presente invención comprende actividad de anticoagulación predefinida provocada por un segundo anticoagulante y, más preferentemente, un segundo anticoagulante seleccionado del grupo que consiste en: LMWH, UFH, danaparoid, rivaroxabán, un pentasacárido y apixabán. Preferentemente, la cantidad de anticoagulante usado para la(s) muestra(s) de calibrador está dentro del intervalo que también se encuentra en las muestras de fluidos corporales.

35 Se entenderá que una o más muestras de calibrador con actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante se pueden usar en el procedimiento de la presente invención para establecer una calibración. El término "al menos uno", por tanto, se refiere a una o más y, preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más muestras de calibrador que difieren entre sí en la actividad de anticoagulación predefinida presente en dichas muestras.

45 El término "factor Xa", como se usa en el presente documento, se refiere a una serina-endopeptidasa activada que puede activar la trombina de la protrombina por escisión proteolítica (E.C. 3.4.21.6). La enzima también se conoce como el factor de Stuart-Power o como protrombinasa. La estructura de la enzima es bien conocida en varias especies animales, incluidos los seres humanos. La secuencia de aminoácidos de una preproteína humana de factor Xa está depositada con la referencia NCBI NP_000495.1 (GI: 4503625), una secuencia de aminoácidos de ratón está depositada con la referencia NCBI NP_001229297.1 (GI: 334724425). Como se analiza en otra parte del presente documento, el factor Xa se activa a partir de su precursor, el factor X, debido a la escisión proteolítica por el complejo de factor tisular/factor VIIa o un complejo de Factor IXa/factor VIIIa. Se entenderá que el término también engloba variantes de dichas proteínas específicas del factor Xa. Dichas variantes son proteínas que difieren en la secuencia de aminoácidos en al menos una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos y que muestran actividad del factor Xa. La secuencia de aminoácidos de una variante del factor Xa es todavía, típicamente, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las proteínas específicas del factor Xa mencionadas anteriormente. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos que se conocen bien en la técnica. Preferentemente, el grado de identidad se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente dentro de una ventana de comparación, tal como la longitud completa de una de las secuencias de aminoácidos o al menos un 50 % de las mismas, donde el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo, interrupciones o protuberancias) en comparación con la secuencia de referencia para una alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácidos idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman 1981, Add. APL. Math. 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda para el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444,

mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferentemente para determinar su alineación óptima y, por lo tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para el peso de huecos y de 0,30 para la longitud del peso de huecos. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos del factor Xa o de los tipos de variantes mencionados anteriormente, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades biológicas esenciales que se han mencionado con anterioridad. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación del factor Xa o formas modificadas químicamente, tales como variantes que se modifican después de la traducción. Además, las variantes incluyen también mutantes modificados genéticamente del factor Xa que tienen, por ejemplo, propiedades de escisión mejoradas.

El término "actividad del factor Xa", como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad biológica conferida por el factor Xa biológicamente activo a una muestra. Una muestra que comprende el factor Xa biológicamente activo es capaz de activar la trombina por escisión proteolítica de la protrombina. La actividad del factor Xa se puede proporcionar en una muestra de fluido corporal de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, ya sea como actividad del factor Xa presente de manera endógena o mediante el suministro exógeno de la muestra con el factor Xa biológicamente activo o una variante del mismo, como se especifica anteriormente. El procedimiento de la presente invención también engloba una muestra de fluido corporal en la que se ha proporcionado la actividad del factor Xa complementando exógenamente la muestra con una enzima activadora del factor X. Las enzimas activadoras del factor X que se pueden aplicar preferentemente incluyen las enzimas activadoras endógenas de la cascada de coagulación de la sangre, tal como el complejo de factor tisular/factor Vila o un complejo de factor IXa/factor Villa u otras enzimas activadoras del factor X naturales o genomanipuladas, tales como como RVV-X del veneno de la víbora de Russel o los venenos de *Vipera lebetina*, el género Bothrops, el género Aistrodon o el género Echis.

El término "medir" como se usa en el presente documento se refiere a evaluar cuantitativamente la actividad del factor Xa presente en una muestra en el procedimiento de la presente invención, es decir, se determina la cantidad de actividad del factor Xa en la muestra. La medición de la actividad del factor Xa se puede lograr detectando la cantidad de factor Xa biológicamente activo presente en dicha muestra. Dicha detección se puede realizar, típicamente, mediante un ensayo que detecta directa o indirectamente la actividad del factor Xa. Dado que la actividad decisiva del factor Xa de acuerdo con la presente invención es la capacidad de escindir protrombina y, por tanto, la actividad de serina proteasa del factor Xa, un ensayo adecuado, preferentemente, tiene como objetivo evaluar la reacción de escisión de un sustrato que comprende un sitio de escisión del factor Xa por el factor Xa. La evaluación de la reacción de escisión puede incluir la detección de la cantidad de sustrato escindido así como la velocidad de la reacción de escisión. Ambos parámetros permiten una evaluación cuantitativa de la actividad del factor Xa presente en la muestra. Además, la medición de la actividad del factor Xa también se puede realizar detectando directamente la cantidad de moléculas del factor Xa biológicamente activas presentes en la muestra, por ejemplo, mediante anticuerpos o aptámeros específicos de confirmación.

Preferentemente, dicha medición de dicha actividad del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, sin embargo, comprende:

- (a) poner en contacto dicha muestra con reactivos que comprenden al menos factor Xa y un sustrato de factor Xa en condiciones que permiten la conversión enzimática del sustrato, por lo que una propiedad física o química del sustrato se cambia de una manera detectable; y
- (b) detectar la extensión del cambio de la propiedad física o química del sustrato; y
- (c) comparar dicha extensión del cambio con una referencia, por lo que se mide la actividad del factor Xa en la muestra.

El término "reactivos" se refiere típicamente a dos reactivos, uno que comprende el factor Xa biológicamente activo y otro que contiene un sustrato del mismo, es decir, un sustrato del factor Xa. La reacción de conversión enzimática del sustrato del factor Xa comienza cuando se añaden ambos reactivos a la muestra y se puede inhibir si hay actividad anticoagulante en la muestra. Es imaginable que ambos componentes del reactivo (es decir, FXa y el sustrato de FXa) también se podrían proporcionar en un reactivo, si medios apropiados evitan que la conversión del sustrato tenga lugar antes de que se añada la muestra de plasma a la mezcla.

Se entenderá que las condiciones mencionadas anteriormente también pueden incluir típicamente la adición de compuestos auxiliares para la conversión enzimática y/o la inhibición de los mismos por determinados anticoagulantes y/o la adición de agentes estabilizantes. De este modo, se pueden estabilizar los componentes de la mezcla de reacción y/o la muestra, y se puede mejorar la normalización o la precisión de la reacción o su sensibilidad/especificidad. Un compuesto auxiliar puede ser antitrombina, que es un componente esencial para la acción de las heparinas sobre el factor Xa. Otros compuestos podrían incluir sulfato de dextrano, antagonistas de

heparina tales como polibreno o heparinasa, estabilizadores tales como albúmina, gelatina, glicina, otras proteínas, moléculas de glúcidos o cualquier otro compuesto que pudiera mejorar la estabilidad de los reactivos. También se pueden añadir sustancias antimicrobianas para evitar la contaminación bacteriana o el crecimiento bacteriano en la solución. También se pueden aplicar antioxidantes o absorbentes de oxígeno.

El término "sustrato del factor Xa", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o polipéptido o un compuesto no peptídico que se puede escindir por la serina proteasa de factor Xa biológicamente activo. Los sustratos de factor Xa peptídicos o polipeptídicos, preferentemente, comprenden un sitio de reconocimiento y escisión del factor Xa y se pueden obtener, por ejemplo, mediante genomanipulación. Tras la escisión del sustrato del factor Xa por el factor Xa, se cambia al menos una propiedad física o química del sustrato. El término "propiedad física o química", como se usa en el presente documento, engloba propiedades físicas tales como peso molecular, tamaño, densidad, resonancia magnética, polarización, densidad óptica, viscosidad, etc., así como propiedades químicas tales como fluorescencia, propiedades de transferencia de energía de resonancia, propiedades cromogénicas, propiedades electroquímicas, propiedades inmunológicas o propiedades bioquímicas. Preferentemente, dicha propiedad física o química se selecciona del grupo que consiste en: propiedades de fluorescencia, propiedades ópticas y propiedades electroquímicas. Típicamente, un sustrato de factor Xa es, por tanto, un sustrato fluorogénico, cromogénico o amperogénico. Los sustratos fluorogénicos o cromogénicos, normalmente, comprenden un fluoróforo o cromóforo y un resto de extinción que están separados por un conector que comprende un sitio de escisión para el factor Xa. En el estado no escindido, el resto de extinción suprime la fluorescencia o el color. Tras la escisión por el factor Xa, el resto de extinción ya no puede suprimir la fluorescencia del fluoróforo o el color del cromóforo. En consecuencia, el grado de fluorescencia o color después de la escisión se puede correlacionar con el grado de actividad del factor Xa expuesto al sustrato. Otros sustratos del factor Xa pueden usar la transferencia de energía de resonancia entre, por ejemplo, un fluoróforo donante y un aceptor. Tras la escisión, la transferencia de energía de resonancia ya no se puede lograr, lo que da como resultado un cambio de fluorescencia. De nuevo, el alcance del cambio se correlaciona con la actividad del factor Xa a la que está expuesto dicho sustrato. Los sustratos preferentes engloban los sustratos cromogénicos S-2732 (Suc-Ile-Glu (gamma-pip)-Gly-Arg-pNA HCl), CH₃SO₂-D-Leu-Gly-Arg-pNA AcOH, CH₃OCO-D-CHG-Gly-Arg-pNA AcOH, C₂H₅OCO-D-Val-Gly-Arg-pNA AcOH, CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA AcOH, Cbo-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA HCl, Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl o los sustratos fluorogénicos CH₃SO₂-D-CHA-Gly-Arg-AMC AcOH o Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC.

Sin embargo, como saben los expertos en la técnica, existen muchos sustratos diferentes que se pueden usar para detectar la actividad de FXa.

La detección del alcance del cambio de la propiedad física o química del sustrato se puede lograr mediante un analizador adecuado que pueda detectar el cambio y su alcance. Dependiendo de la naturaleza del cambio de la propiedad física o química, se pueden aplicar diferentes analizadores que son bien conocidos por los expertos. Típicamente, un analizador se puede basar, por tanto, en la medición de señales de variables ópticas (por ejemplo, absorbancia o fluorescencia), señales de variables eléctricas (por ejemplo, resistencia, capacitancia, impedancia o combinaciones de las mismas), señales derivadas de señales de resonancia magnética del sustrato de factor Xa en estado escindido y no escindido. Basándose en el cambio de la intensidad de dicha señal, se puede determinar la extensión del cambio que se correlaciona con la eficiencia de la reacción enzimática y, por tanto, con la actividad del factor Xa en la muestra. Se entenderá que la actividad del factor Xa medida estará influenciada por la actividad anticoagulante debida a la presencia del primer o el segundo anticoagulante en una muestra respectiva.

El cálculo de un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprende comparar la primera actividad del factor Xa medida de la muestra de fluido corporal con la segunda actividad del factor Xa medida de al menos una muestra del calibrador, en el que se ha asignado un parámetro universal de calibración para la actividad del factor Xa a dicha segunda actividad del factor Xa medida. Posteriormente, un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba de fluido corporal se puede derivar de dichos parámetros universales de calibración. Preferentemente, el parámetro universal de calibración (P) se calcula mediante el siguiente cálculo: $P = 100 + (100 * \text{actividad de anticoagulación medida})$. Dicho cálculo se puede llevar a cabo, preferentemente, en un dispositivo de procesamiento de datos, tal como un ordenador que tiene incrustado de forma tangible un código de programa de ordenador que lleva a cabo dicho cálculo automáticamente.

El parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de fluido corporal se comparará finalmente con los intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes. Dependiendo de si el parámetro universal se encuentra dentro del intervalo predefinido de uno o más de los anticoagulantes o está fuera de los intervalos, se puede extraer una conclusión sobre la fuerza de la actividad anticoagulante, la naturaleza del anticoagulante y/o la cantidad de anticoagulante que está presente en la muestra de fluido corporal del paciente. Además, es posible calcular la actividad del factor Xa específica para el anticoagulante y/o determinar la dosis de anticoagulante que se puede haber administrado a un paciente. En consecuencia, se pueden sacar conclusiones sobre el tratamiento anticoagulante en un paciente aplicando el procedimiento de la presente invención. La comparación, así como una posible extracción de conclusiones, se pueden llevar a cabo, preferentemente, en un dispositivo de procesamiento de datos, tal como un ordenador que tenga incrustado de forma tangible un código de programa informático adecuado.

Los intervalos predefinidos se determinan analizando muestras de la población de pacientes apropiada. Por ejemplo, se podrían analizar muestras de pacientes que hubieran recibido rivaroxabán en una dosis profiláctica, extrayendo la muestra de sangre 2-3 horas después de que el paciente tomara la última dosis. Los valores resultantes se analizarían a continuación estadísticamente, por ejemplo, determinando el intervalo de confianza del 95 % de la actividad anticoagulante. El análisis mencionado anteriormente proporcionaría el valor máximo esperado de los pacientes tratados con rivaroxabán en una dosis profiláctica.

Otro ejemplo sería un análisis de muestras tratadas con LMWH en una dosis específica cuando la obtención de muestras se realiza justo antes de la aplicación de la siguiente dosis de LMWH. Este análisis proporcionaría el nivel mínimo esperado de la actividad anticoagulante en pacientes tratados con HBPM en esta dosis específica.

Preferentemente, el procedimiento de la presente invención, por lo tanto, también comprende la etapa de determinar la dosis del primer anticoagulante que se ha administrado al sujeto basándose en los resultados de la determinación en la etapa (d). Dicha determinación de la dosis se puede llevar a cabo, preferentemente, en un dispositivo de procesamiento de datos, tal como un ordenador que tiene incrustado de forma tangible un código de programa informático que lleva a cabo dicha determinación automáticamente.

A continuación se describen modos de realización preferentes particulares del procedimiento de la presente invención:

En un modo de realización particular del procedimiento de la invención, la muestra que se va a analizar es plasma citratado. Dicho plasma citratado se pone en contacto con una mezcla de reacción que comprende factor Xa y un sustrato cromogénico y, en particular, S-2732. Típicamente, dicha mezcla de reacción comprende además tampones y estabilizadores. La conversión de sustrato enzimático se mide típicamente registrando continuamente la absorbancia de la solución a 405 nm. Una tasa de conversión alta del sustrato por el factor Xa da como resultado un aumento pronunciado de la densidad óptica que se expresa por el delta-E durante la reacción (cambio de densidad óptica durante la reacción). Una tasa de conversión baja da como resultado un delta-E bajo. Dependiendo de la actividad inhibitoria de la muestra contra el factor Xa en el reactivo, se detectan diferentes tasas de absorción. Preferentemente, se aplican cuatro muestras de calibrador. Típicamente, dichas muestras comprenden 0, 0,5, 1 y 1,5 unidades anti-factor Xa FMWH/ml calibradas contra el estándar actual de FMWH de la OMS. Las muestras de calibrador se pueden proporcionar en una forma premezclada o se pueden obtener mediante la dilución adecuada de la muestra de calibrador que tenga la mayor concentración de FMWH. Los valores asignados para la calibración son, preferentemente, 100 XU para el calibrador de 0 unidad anti-Xa/ml, 150 XU para el calibrador de 0,5 unidad anti-Xa/ml, 200 XU para el calibrador de 1 unidad anti-Xa/ml y 250 XU para el calibrador de 1,5 unidad anti-Xa/ml, donde "XU" representa una unidad arbitraria de actividad anticoagulante dirigida contra el factor Xa. Usando esta calibración, los resultados del procedimiento se expresan en XU. Si la muestra contiene poca o ninguna actividad anticoagulante dirigida contra el factor Xa, la XU está cerca de 100 y es cada vez más alta en caso de que esté presente una actividad contra el factor Xa. Cuando los intervalos de valores esperados para más de un anticoagulante están predefinidos, la actividad anticoagulante se puede evaluar cualitativa y cuantitativamente mediante una comparación con dichos intervalos de valores esperados.

En otro modo de realización preferente particular del procedimiento de la invención, la cantidad de anticoagulante administrada a un sujeto se puede calcular a partir de la XU después de que el anticoagulante administrado se haya asignado a los valores de XU determinados.

El algoritmo mencionado para calcular las unidades anticoagulantes universales da como resultado resultados típicos de prueba de alrededor de 100 XU (sin actividad anticoagulante) y valores que aumentan a valores alrededor de 150 XU, 200 XU o incluso valores más altos para muestras con actividad anticoagulante. Este sistema de unidades es fácil de memorizar, pero, por otra parte no se confunde con los valores de INR (como una expresión del tiempo de protrombina) o los resultados de aPTT. Sin embargo, es obvio que, según el procedimiento de la invención, también se podrían definir otros sistemas de unidades, donde, por ejemplo, la muestra sin anticoagulantes podría tener resultados de 0 XU, 1 XU o 1000 XU, o cualquier valor intermedio.

Se descubrió sorprendentemente, de acuerdo con la presente invención, que es posible calibrar el resultado de los ensayos de inhibición del factor Xa frente a un anticoagulante, expresar los resultados en unidades arbitrarias y usar esta calibración también para evaluar las actividades de otros fármacos anticoagulantes. De este modo, se recibe una técnica de calibración universal que permite normalizar los resultados de las pruebas de inhibición del factor Xa para una variedad de fármacos que actúan contra esta vía. Además, se descubrió que en una etapa posterior de la evaluación de la actividad anticoagulante es posible calcular, basándose en los resultados de la calibración universal, la actividad individual del fármaco que corresponde a la actividad de inhibición del factor Xa universal que se midió, lo que, por lo tanto, permite a los médicos calcular la actividad del fármaco basándose en la actividad de inhibición del factor Xa que se determinó.

Desde la perspectiva de la eficiencia de las pruebas, el procedimiento de la invención tiene la ventaja de que simplifica el flujo de trabajo, ya que solo se requiere una calibración para las pruebas antifactor Xa, lo que significa que solo se requiere un conjunto de calibradores, un conjunto de controles y un programa de pruebas de competencia. También se simplifica el proceso de solicitud, ya que solo se puede solicitar una prueba (prueba anti-factor Xa) y no varias

opciones diferentes (LMWH, UFH, rivaroxabán, apixabán, etc.). Además, desde una perspectiva de valor médico, los riesgos se reducen, porque la expresión de los resultados del procedimiento de ensayo es tan genérica como el propio procedimiento de prueba. Por el contrario, en la técnica anterior, la expresión del ensayo da como resultado una concentración de fármaco que es más específica que la prueba en sí, lo que puede crear interpretaciones erróneas y errores en caso de que se cometa un error en una etapa temprana del proceso de diagnóstico, es decir, cuando se ordena la prueba. Con el procedimiento de la invención, los resultados se expresan como unidades genéricas de inhibición del factor Xa y, por lo tanto, reflejan lo que se midió, es decir, la inhibición del factor Xa. En las pruebas de la técnica anterior, por ejemplo, se podría haber informado de una concentración de rivaroxabán, aunque es posible que el paciente recibiera apixabán, un pentasacárido o cualquier otro fármaco que inhibiera el factor Xa.

En el procedimiento de la presente invención, aquello de lo que se informa está más estrechamente relacionado con aquello que se midió (es decir, la inhibición del factor Xa). Esto elimina el riesgo de que una solicitud incorrecta de la prueba al principio de la cadena de diagnóstico se propague a través del proceso de diagnóstico y, finalmente, ~~de-dé~~ lugar a que el laboratorio comunique una información errónea (por ejemplo, una concentración de rivaroxabán, aunque el paciente no recibió este fármaco). De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, todavía es posible expresar los resultados como concentraciones de fármaco, pero esto se decide más adelante en la cadena de diagnóstico y es transparente para el médico que seleccionaría el fármaco en un sistema de información de laboratorio y solicitaría calcular la concentración del fármaco a partir de la actividad anti-factor Xa o esto sucedería automáticamente a nivel del sistema de información del hospital en base a la información de prescripción del fármaco disponible en el sistema.

Las explicaciones y definiciones de los términos dados anteriormente se aplican a continuación, haciendo los cambios necesarios, a todos los modos de realización siguientes, excepto si se especifica de otro modo.

En un procedimiento preferente de la presente invención, dicho procedimiento comprende además una etapa de recomendar una medida terapéutica o de diagnóstico basada en la actividad anticoagulante determinada.

El término "medida terapéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medida que influye o puede depender del estado de coagulación del sujeto. Preferentemente, las medidas terapéuticas incluyen la administración de fármacos, la adaptación de la dosis del fármaco, la aplicación de cirugía, el tratamiento de heridas y lesiones, la adaptación del estilo de vida y/o la nutrición y similares. El término "medida de diagnóstico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medida destinada a determinar el estado de coagulación en un sujeto, incluyendo el procedimiento de la presente invención. Las medidas de diagnóstico incluyen la selección de una prueba de diagnóstico, así como la decisión sobre la frecuencia del diagnóstico.

En otro procedimiento preferente de la presente invención, dicho procedimiento comprende además una etapa de aplicación de una medida terapéutica o de diagnóstico basada en la actividad anticoagulante determinada.

En otro procedimiento preferente de la presente invención, dicho procedimiento comprende además una etapa de control del sujeto basándose en la actividad anticoagulante determinada.

La presente invención también se refiere a un código de programa informático incrustado de forma tangible en un procesador de datos, llevando a cabo dicho código de programa informático al menos las etapas c) y d) del procedimiento de la invención.

Además, la presente invención se refiere a un sistema para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende:

- (a) una unidad de análisis que puede medir la actividad del factor Xa en una muestra de dicho sujeto y en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante; y
- (b) una unidad de evaluación que comprende (i) un algoritmo implementado por ordenador que calcula un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba basada en la primera y la segunda actividades del factor Xa medidas, y (ii) un algoritmo implementado por ordenador que compara dicho parámetro para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes.

El término "sistema", como se usa en el presente documento, se refiere a una disposición en la que las unidades mencionadas anteriormente están unidas de forma funcional entre sí de modo que se puede lograr la determinación de la actividad anticoagulante. Las unidades pueden estar comprendidas en alojamientos separados o dentro de un solo alojamiento. Ambas unidades deben estar unidas de forma funcional, ya sea por cable o de forma inalámbrica, por ejemplo, por medio de una LAN inalámbrica, Bluetooth o por medio de Internet. En consecuencia, las unidades no deben necesariamente estar en proximidad física. Sin embargo, la unión funcional requiere que la actividad del factor Xa que se mide por la unidad de análisis se transmita a la unidad de evaluación de modo que dicha unidad de

evaluación pueda realizar las etapas de evaluación mencionadas anteriormente basándose en los datos de actividad del factor Xa transmitidos.

5 La unidad de análisis de acuerdo con la presente divulgación es, preferentemente, un aparato o módulo independiente dentro de un instrumento mayor, que realiza una o más de las detecciones, por ejemplo, la medición de la actividad del factor Xa de manera cuantitativa y/o cualitativa. Por ejemplo, una unidad de análisis puede realizar o ayudar con el pipeteo, dosificación, mezcla de muestras y/o reactivos. Una unidad de análisis puede comprender una unidad de retención de reactivos para retener reactivos para realizar los ensayos. Los reactivos pueden estar dispuestos, por ejemplo, en forma de recipientes o casetes que contienen reactivos individuales o un grupo de reactivos, colocados en receptáculos o posiciones apropiados dentro de un compartimento de almacenamiento o transportador. De acuerdo con algunos modos de realización, una unidad de análisis puede estar configurada para la detección óptica de un analito, por ejemplo, un sustrato cromogénico, fluorogénico o amperogénico antes y/o después de su conversión enzimática por el factor Xa. Una unidad de análisis ejemplar configurada para la detección óptica comprende un dispositivo configurado para convertir energía electromagnética en una señal eléctrica, que incluye detectores ópticos de un solo elemento y de múltiples elementos o de matriz. De acuerdo con la presente divulgación, un detector óptico puede monitorizar una señal electromagnética óptica y proporcionar una señal de salida eléctrica o una señal de respuesta con respecto a una señal de línea de base indicativa de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra que se sitúa en una trayectoria óptica. Dichos dispositivos también pueden incluir, por ejemplo, fotodiodos, incluyendo fotodiodos de avalancha, fototransistores, detectores fotoconductores, matrices de sensores lineales, detectores CCD, detectores CMOS, incluidos detectores de matrices CMOS, fotomultiplicadores y matrices fotomultiplicadoras. De acuerdo con determinados modos de realización, un detector óptico, tal como un fotodiodo o un fotomultiplicador, puede contener un sistema adicional de acondicionamiento o procesamiento de señales. Por ejemplo, un detector óptico puede incluir al menos un preamplificador, filtro electrónico o circuito integrado. Los preamplificadores adecuados incluyen, por ejemplo, preamplificadores de integración, transimpedancia y ganancia de corriente (espejo de corriente). Además, una o más unidades de análisis de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender una fuente de luz para emitir luz. Por ejemplo, una fuente de luz de una unidad de análisis puede consistir en al menos un elemento emisor de luz (tal como un diodo emisor de luz, una fuente de radiación eléctrica, tal como una lámpara incandescente, una lámpara electroluminiscente, una lámpara de descarga de gas, un lámpara de descarga de alta intensidad, un láser) para medir las concentraciones de analito con una muestra que se está analizando o para permitir una transferencia de energía (por ejemplo, a través de transferencia de energía de resonancia fluorescente o catalizando una enzima). Además, una unidad de análisis del sistema puede incluir una o más unidades de incubación (por ejemplo, para poner en contacto dicha muestra con una mezcla de reacción que comprende al menos factor Xa y un sustrato de factor Xa en condiciones que permiten la conversión enzimática del sustrato, por lo que una propiedad física o química del sustrato se cambia de manera detectable).

35 Además, una unidad de análisis del sistema divulgado en el presente documento puede comprender, o estar conectada de forma funcional a, un recipiente de reacción o unidad de alimentación de cubetas. Las unidades de alimentación ejemplares incluyen unidades de procesamiento de líquido, tales como una unidad de pipeteo, para suministrar muestras y/o reactivos a los recipientes de reacción. La unidad de pipeteo puede comprender una aguja lavable reutilizable, por ejemplo, una aguja de acero, o puntas de pipeta desechables. La unidad de análisis puede comprender además una o más unidades de mezcla, por ejemplo, un agitador para agitar una cubeta que comprende un líquido o una paleta de mezcla para mezclar líquidos en una cubeta o recipiente de reactivos.

45 La unidad de evaluación, típicamente, comprende un dispositivo de procesamiento de datos que ha implementado los algoritmos mencionados anteriormente para calcular el parámetro universal y para compararlo con los intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes. Dichos intervalos predefinidos se pueden almacenar en una memoria que, típicamente, también está comprendida en la unidad de evaluación. Un dispositivo de procesamiento de datos puede ser un ordenador de propósito general o un dispositivo informático portátil, por ejemplo. También debe entenderse que se pueden usar múltiples dispositivos informáticos juntos, tal como en una red u otros procedimientos de transferencia de datos, para realizar una o más etapas de los procedimientos divulgados en el presente documento. Los dispositivos informáticos ejemplares incluyen ordenadores de sobremesa, ordenadores portátiles, asistentes de datos personales ("PDA"), tal como dispositivos móviles, tabletas, servidores y similares. En general, un dispositivo de procesamiento de datos comprende un procesador que puede ejecutar una pluralidad de instrucciones, tal como un algoritmo en forma de un código de programa informático. 50 Un dispositivo de procesamiento de datos, típicamente, tiene acceso a una memoria. Una memoria es un medio legible por ordenador y puede comprender un solo dispositivo de almacenamiento o múltiples dispositivos de almacenamiento, situados localmente con el dispositivo informático o accesibles al dispositivo informático a través de una red, por ejemplo. Los medios legibles por ordenador pueden ser cualquier medio disponible al que pueda acceder el dispositivo informático e incluye medios volátiles y no volátiles. Además, los medios legibles por ordenador pueden ser uno o ambos de medios extraíbles y no extraíbles. A modo de ejemplo, y no de limitación, los medios legibles por ordenador pueden comprender medios de almacenamiento informáticos. Los medios de almacenamiento informáticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash o cualquier otra tecnología de memoria, CD-ROM, Disco Digital Versátil (DVD) u otro almacenamiento en disco óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que se pueda usar para almacenar una pluralidad de instrucciones a las que pueda acceder el dispositivo de procesamiento de datos y que puedan ser ejecutadas por el procesador de datos de dicho dispositivo. 65

El programa informático típicamente presente en la unidad de evaluación puede incluir, en general, instrucciones que, cuando son ejecutadas por un procesador del dispositivo de procesamiento de datos, pueden realizar una o más etapas de los procedimientos divulgados en el presente documento. Algunas de las instrucciones se pueden adaptar para producir señales que controlan el funcionamiento de otras máquinas y, por tanto, pueden funcionar a través de esas señales de control para transformar materiales muy alejados del ordenador. Dichas instrucciones también pueden comprender un algoritmo que, en general, está concebido como una secuencia de etapas coherente que da lugar a un resultado deseado. Estas etapas son aquellas que requieren manipulaciones físicas de cantidades físicas. Normalmente, aunque no necesariamente, estas cantidades toman la forma de pulsos o señales eléctricos o magnéticos que se pueden almacenar, transferir, transformar, combinar, comparar y manipular de otro modo. En ocasiones resulta conveniente, principalmente por razones de uso común, referirse a estas señales como valores, caracteres, datos de visualización, números o similares como una referencia a los elementos físicos o manifestaciones en que se incorporan o expresan dichas señales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que todos estos términos y otros similares se deben asociar con las cantidades físicas apropiadas y se usan simplemente en el presente documento como etiquetas convenientes aplicadas a estas cantidades. De acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, los algoritmos para calcular el parámetro universal y para compararlo con los intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes, se incorporan y realizan ejecutando las instrucciones. El dispositivo de procesamiento de datos también puede tener acceso a un dispositivo de salida. Los dispositivos de salida ejemplares incluyen máquinas de fax, pantallas, impresoras y archivos, por ejemplo. De acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, un dispositivo de procesamiento de datos puede realizar una o más etapas de un procedimiento divulgado en el presente documento, y, después de esto, proporcionar una salida, por medio de un dispositivo de salida.

Preferentemente, el algoritmo implementado por ordenador que calcula de un parámetro universal para la actividad de anticoagulación compara la primera actividad del factor Xa medida con la segunda actividad del factor Xa medida de la al menos una muestra de calibrador, en el que un parámetro universal de calibración para la actividad del factor Xa se ha asignado a dicha segunda actividad del factor Xa medida, y deriva el parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba de fluido corporal de dicho parámetro universal de calibración.

Además, la presente invención proporciona un kit para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra que comprende al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante y, preferentemente, factor Xa y un sustrato de factor Xa.

El término "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de los componentes mencionados anteriormente, preferentemente, proporcionados por separado o en un único recipiente. Las muestras, así como el factor Xa y el sustrato de factor Xa, se pueden proporcionar en el kit de la invención en forma líquida "lista para usar" o en forma seca, en el que el factor Xa y el sustrato de factor Xa se proporcionan en dos recipientes separados, o en combinación. En este último caso, se puede requerir la adición de un disolvente para llevar a cabo el procedimiento de la invención. Disolventes adecuados son bien conocidos por los expertos y, preferentemente, pueden también estar incluidos en el kit de la invención. El kit puede incluir además controles, tampones y/o reactivos. El kit también comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, así como información sobre los valores esperados para al menos 3 anticoagulantes. Estas instrucciones pueden estar en forma de un manual, información accesible electrónicamente o se pueden proporcionar mediante un código de programa informático que pueda llevar a cabo los cálculos y comparaciones a los que se hace referencia en los procedimientos de la presente invención y establecer una determinación de la actividad anticoagulante cuando se implementa en un ordenador o un dispositivo de procesamiento de datos. El código del programa informático se puede proporcionar en un medio o dispositivo de almacenamiento de datos, tal como un medio de almacenamiento óptico (por ejemplo, un disco compacto) o directamente en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento, código de programa informático, sistema o kit como se describe anteriormente en el que se mide la actividad del factor IIa en lugar de la actividad del factor Xa.

Por lo tanto, la invención también engloba un procedimiento para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende:

- (a) medir una primera actividad del factor IIa en una muestra de prueba de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) medir una segunda actividad del factor IIa en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante;
- (c) calcular un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba en base a la primera y la segunda actividades del factor IIa medidas;
- (d) comparar dicho parámetro para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes para determinar la actividad anticoagulante.

El término "factor IIa", como se usa en el presente documento, se refiere a una serina-endopeptidasa activada que pueda activar el fibrinógeno a fibrina por escisión proteolítica (E.C. 3.4.21.5). Además, la enzima es además capaz de convertir los factores XI a XII, VIII a VIIIa y V a Va. La enzima también se conoce como trombina. La estructura de la enzima es bien conocida en varias especies animales, incluidos los seres humanos. La secuencia de aminoácidos de una preproteína humana de trombina está depositada con la referencia NCBI NP_000497.1 (GI: 4503635), una secuencia de aminoácidos de ratón está depositada con la referencia NCBI NP_034298.1 (GI: 6753798). Como se analiza en otra parte del presente documento, la trombina se activa a partir de su precursor, la protrombina, debido a la escisión proteolítica por el factor Xa. Se entenderá que el término también engloba variantes de dichas proteínas de trombina específicas. Dichas variantes son proteínas que difieren en la secuencia de aminoácidos en al menos una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos y que muestran actividad de la trombina. La secuencia de aminoácidos de una variante de la trombina es todavía, típicamente, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las proteínas específicas de la trombina mencionadas anteriormente. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos que se conocen bien en la técnica. Preferentemente, el grado de identidad se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente dentro de una ventana de comparación, tal como la longitud completa de una de las secuencias de aminoácidos o al menos un 50 % de las mismas, donde el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo, huecos o protuberancias) en comparación con la secuencia de referencia para una alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácidos idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman 1981, *Add. APL. Math.* 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda para el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferentemente para determinar su alineación óptima y, por lo tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para el peso de huecos y de 0,30 para la longitud del peso de huecos. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parólogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de trombina o de los tipos de variantes mencionados anteriormente, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades biológicas esenciales que se han mencionado con anterioridad. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de la trombina o formas modificadas químicamente, tales como variantes que se modifican después de la traducción. Además, las variantes incluyen también mutantes modificados genéticamente de la trombina que tienen, por ejemplo, propiedades de escisión mejoradas.

El término "actividad del factor IIa o trombina", como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad biológica conferida por la trombina biológicamente activa a una muestra. Una muestra que comprende trombina biológicamente activa puede activar la fibrina a partir del fibrinógeno por escisión proteolítica. La actividad de la trombina se puede proporcionar en una muestra de fluido corporal de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, ya sea como actividad de la trombina presente de manera endógena o mediante el suministro exógeno de la muestra con trombina biológicamente activa o una variante de la misma, como se especifica anteriormente. El procedimiento de la presente invención también engloba una muestra de fluido corporal en la que se ha proporcionado la actividad de la trombina complementando exógenamente la muestra con una enzima activadora de la trombina. Las enzimas activadoras de la trombina que se pueden aplicar preferentemente incluyen las enzimas activadoras endógenas de la cascada de coagulación sanguínea, tales como el factor Xa.

En un modo de realización preferente del procedimiento mencionado anteriormente, dicho primer y dicho segundo anticoagulantes son diferentes.

En un modo de realización preferente de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, dicha medición de dicha actividad del factor IIa en una muestra comprende:

- (a) poner en contacto dicha muestra con una mezcla de reacción que comprende al menos factor IIa y un sustrato de factor IIa en condiciones que permiten la conversión enzimática del sustrato, por lo que una propiedad física o química del sustrato se cambia de una manera detectable; y
- (b) detectar la extensión del cambio de la propiedad física o química del sustrato; y
- (c) comparar dicha extensión del cambio con una referencia, por lo que se mide la cantidad de la actividad del anti-factor IIa en la muestra. Más preferentemente, dicha propiedad física o química se selecciona del grupo que consiste en: propiedades de fluorescencia, propiedades ópticas y propiedades electroquímicas.

Los sustratos preferentes engloban los sustratos cromogénicos Bz-FVR-pNA , H-D-Phe-Homopro-Arg-pNA • 2 acetato, Sar-Pro-Arg-pNA, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA • AcOH, H-D-CHG-Ala-Arg-pNA • 2AcOH, H-D-CHG-But-Arg-pNA • 2AcOH, H-D-CHG-Pro-Arg-pNA • 2AcOH, H-D-CHA-Ala-Arg-pNA • 2AcOH, H-D-CHA-Gly-Arg-pNA • 2AcOH o CH₃OCO-Gly-Pro-Arg-pNA • AcOH, así como los sustratos fluorogénicos Boc-Val-Arg-AMC • HCl, Boc-VPR-AMC, Bz-FVR-AMC o H-D-CHA-Ala-Arg-AMC • 2AcOH.

Sin embargo, como saben los expertos en la técnica, existen muchos sustratos diferentes que se pueden usar para detectar la actividad de FXa.

En otro modo de realización preferente de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, dicho sujeto es un mamífero y, preferentemente, un ser humano.

Aún en un modo de realización preferente de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en el que dicha muestra de prueba de fluido corporal es una muestra de orina, una muestra de sangre total o una muestra de plasma sanguíneo.

En un modo de realización preferente de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, dicho cálculo de un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprende comparar la primera actividad del factor IIa medida con la segunda actividad del factor IIa medida de la al menos una muestra de calibrador, en el que un parámetro universal de calibración para la actividad del anti-factor IIa se ha asignado a dicha segunda actividad del factor IIa medida, y derivar el parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba de fluido corporal de dicho parámetro universal de calibración. Más preferentemente, el parámetro universal asignado (P) se calcula mediante el siguiente cálculo: $P = 100 + (\text{factor} \cdot \text{cantidad o actividad del anticoagulante usado para la calibración})$.

El factor se debe seleccionar de forma que una dosis terapéutica típica del anticoagulante proporcione un parámetro de anticoagulación universal de 200 IIU (unidades arbitrarias de actividad anti-factor IIa).

En un modo de realización preferente de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, dicho primer y/o segundo anticoagulantes se seleccionan del grupo que consiste en: hirudina recombinante, dabidatrán, argatrobán y bivalirudina.

En otro modo de realización preferente de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, al menos las etapas c) y d) se llevan a cabo mediante un algoritmo implementado por ordenador.

Además, se engloba un código de programa informático incrustado de forma tangible en un procesador de datos, llevando a cabo dicho código de programa informático al menos las etapas c) y d) de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente.

Además, se engloba un sistema para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende:

- (a) una unidad de análisis que puede medir la actividad del factor IIa en una muestra de dicho sujeto y en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante; y
- (b) una unidad de evaluación que comprende (i) un algoritmo implementado por ordenador que calcula un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba basada en la primera y la segunda actividades del factor IIa medidas, y (ii) un algoritmo implementado por ordenador que compara dicho parámetro para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes.

En un modo de realización preferente del sistema mencionado anteriormente, dicho algoritmo implementado por ordenador que calcula de un parámetro universal para la actividad de anticoagulación compara la primera actividad del factor IIa medida con la segunda actividad del factor IIa medida de la al menos una muestra de calibrador, en el que un parámetro universal de calibración para la actividad del factor IIa se ha asignado a dicha segunda actividad del factor IIa medida, y deriva el parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba de fluido corporal de dicho parámetro universal de calibración.

Finalmente, se proporciona un kit para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra que comprende al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante y, preferentemente, factor IIa y un sustrato de factor IIa.

Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia con respecto a todo su contenido de divulgación y al contenido de divulgación específicamente mencionado en esta memoria descriptiva.

FIGURAS

5 La **Fig. 1** muestra una calibración universal usando los calibradores de LMWH. La calibración se realizó en unidades arbitrarias llamadas "XU" y se ha asignado a aXa U/ml (aXa = antifactor Xa).

La **Fig. 2** muestra curvas de calibración para heparina en diferentes laboratorios (Fig. 2 A Laboratorio A, Fig. 2 B Laboratorio B, Fig. 2 C Laboratorio C y Fig. 2 D Laboratorio D).

10 La **Fig. 3** muestra curvas de calibración para rivaroxabán en diferentes laboratorios (Fig. 3 A Laboratorio A, Fig. 3 B Laboratorio B, Fig. 3 C Laboratorio C y Fig. 3 D Laboratorio D).

La **Fig. 4** muestra las curvas de calibración para Orgaran en diferentes laboratorios (Fig. 4 A Laboratorio A, Fig. 4 B Laboratorio B, Fig. 4 C Laboratorio C y Fig. 4 D Laboratorio D).

15 La **Fig. 5** muestra curvas de calibración universal en diferentes laboratorios (Fig. 5 A Laboratorio A, Fig. 5 B Laboratorio B, Fig. 5 C Laboratorio C y Fig. 5 D Laboratorio D).

20 La **figura 6** muestra las curvas de calibración para la actividad de heparina (A), rivaroxabán (B) y Orgaran (C) a partir de las unidades de calibración universal.

EJEMPLOS

25 Los siguientes ejemplos simplemente ilustrarán la invención o los aspectos de la misma. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera que limite el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Evaluación del concepto de calibración universal (Unitest) para antagonistas del factor Xa

30 El objetivo del estudio fue mostrar que la calibración universal permite monitorizar diversos anticoagulantes diferentes dirigidos contra el factor Xa usando una única curva de calibración, en lugar del estado actual de la técnica con diversas curvas de calibración. También se demostrará que es posible transformar los resultados de la calibración universal en las concentraciones reales del fármaco.

35 Las muestras de control para 3 anticoagulantes diferentes (heparina de bajo peso molecular, rivaroxabán = Xarelto®, danaparoid = Orgaran®) se enviaron a 4 laboratorios y se analizaron por duplicado en 3 días. El día 1 también se determinaron las curvas de calibración para los anticoagulantes individuales.

Además de calcular las calibraciones individuales, también se determinó una calibración universal.

40 A continuación se evalúa si la calibración universal proporciona un buen acuerdo para los tres centros en comparación con las calibraciones individuales.

Los siguientes calibradores se enviaron a los laboratorios y se sometieron a ensayo el día 1:

45 Tabla 1: Lista de calibradores para los diferentes laboratorios

Calibrador		Concentración asignada	
Calibrador de heparina	Cal1	0	aXa U/ml
Calibrador de heparina	Cal2	0,36	aXa U/ml
Calibrador de heparina	Cal3	0,76	aXa U/ml
Calibrador de heparina	Cal4	1,21	aXa U/ml
Calibrador de heparina	Cal5	1,65	aXa U/ml
Calibrador de rivaroxabán	Cal1	0	µg/ml
Calibrador de rivaroxabán	Cal2	0,25	µg/ml
Calibrador de rivaroxabán	Cal3	0,49	µg/ml
Calibrador de Orgaran	Cal1	0	Orgaran U/ml
Calibrador de Orgaran	Cal2	0,4	Orgaran U/ml
Calibrador de Orgaran	Cal3	0,8	Orgaran U/ml

Calibrador de Orgaran	Cal4	1,2	Orgaran U/ml
Calibrador de Orgaran	Cal5	1,6	Orgaran U/ml

Los siguientes controles se enviaron a los laboratorios y se analizaron en los días 1-3:

Tabla 2: Lista de controles para los diferentes laboratorios

5

Control		Concentración asignada	
Control Normal	Principio activo	0	aXa U/ml
Control de LMWH	CI	0,25	aXa U/ml
Control de LMWH	CII	0,48	aXa U/ml
Control de LMWH	C3	0,8	aXa U/ml
Control de LMWH	C4	1,2	aXa U/ml
Control de rivaroxabán	C1	0,09	µg/ml
Control de rivaroxabán	C2	0,3	µg/ml
Control de Orgaran	C1	0,48	Orgaran U/ml
Control de Orgaran	C2	1	Orgaran U/ml

El ensayo se llevó a cabo como sigue:

10 Las muestras se reconstituyeron antes del análisis. La muestra se añadió a una solución que contenía factor Xa bovino y a una segunda solución que contenía el sustrato cromogénico S-2732 (Suc-Ile-Glu (gamma-pip)-Gly-Arg-pNA, HCl). Se mide la densidad óptica de la solución y se informa del cambio de densidad óptica. Los calibradores de plasma sometidos a ensayo y los controles se obtuvieron comercialmente de Hyphen biomed, el ensayo anti-Xa está disponible comercialmente de Instrumentation Laboratory.

15 Se determinó una calibración universal utilizando los calibradores de LMWH. La calibración se realizó en unidades arbitrarias llamadas "XU". La relación de aXa U/ml asignada a XU fue la siguiente:

Actividad anticoagulante en XU = 100 + 100 * actividad anticoagulante en aXa U/ml; véase la Fig. 1.

20 Las muestras enviadas a los laboratorios se analizaron en tres días separados y se informó de los resultados.

Tabla 3: Datos brutos de las calibraciones

		Laboratorio A		Laboratorio B		Laboratorio C		Laboratorio D	
		dE1	dE2	dE1	dE2	dE1	dE2	dE1	dE2
Heparina	Cal1	1039	1033	1505	1478	1022	1035	989	973
Heparina	Cal2	821	833	1223	1168	817	820	796	783
Heparina	Cal3	646	667	967	980	642	667	633	631
Heparina	Cal4	508	494	770	788	512	525	508	511
Heparina	Cal5	415	396	649	658	427	414	419	400
Rivaroxabán	Cal1	1073	1078	1555	1498	1039	1040	988	997
Rivaroxabán	Cal2	220	221	302	273	205	204	221	215
Rivaroxabán	Cal3	80	79	121	112	87	85	91	94
Orgaran	Cal1	1074	1065	1578	1533	1036	1044	1011	1002
Orgaran	Cal2	766	781	1146	1156	755	790	738	736
Orgaran	Cal3	555	549	868	895	577	597	550	536
Orgaran	Cal4	425	420	724	692	453	473	445	428

ES 2 725 426 T3

Orgaran	Cal5	338	328	558	567	360	380	343	351
---------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tabla 4: Datos brutos de los controles

		Control	Control de LMWH				Rivaroxabán c.		Orgaran c.	
	día	Normal	CI	CII	C3	C4	C1	C2	C1	C2
Laboratorio A	1	1094	878	748	639	494	558	181	724	499
Laboratorio A	1	1085	885	733	604	483	582	175	718	491
Laboratorio A	2	1038	838	721	612	479	547	174	708	465
Laboratorio A	2	1076	850	752	629	500	564	168	699	471
Laboratorio A	3	1082	874	744	622	494	585	168	707	462
Laboratorio A	3	1076	873	751	624	499	585	182	711	472
Laboratorio B	1	1512	1249	1115	958	713	818	234	1076	771
Laboratorio B	1	1517	1307	1109	951	761	864	235	1037	734
Laboratorio B	2	1497	1311	1086	922	738	911	228	1066	753
Laboratorio B	2	1452	1267	1097	956	759	851	235	1021	779
Laboratorio B	3	1481	1310	1113	950	784	847	224	1047	755
Laboratorio B	3	1480	1270	1111	941	764	827	233	1075	754
Laboratorio C	1	1067	859	631	569	521	568	157	717	496
Laboratorio C	1	1070	887	652	636	496	565	164	702	494
Laboratorio C	2	1062	874	760	634	510	555	160	694	503
Laboratorio C	2	1054	850	745	626	499	557	161	699	503
Laboratorio C	3	1058	869	747	619	512	577	159	718	501
Laboratorio C	3	1063	869	741	643	517	576	168	722	516
Laboratorio D	1	1023	819	722	613	492	572	181	682	488
Laboratorio D	1	1020	815	721	613	484	563	178	686	477
Laboratorio D	2	1030	841	730	608	479	526	177	687	476
Laboratorio D	2	1017	841	726	613	487	579	178	702	489
Laboratorio D	3	1032	840	735	616	492	596	179	692	496
Laboratorio D	3	1023	819	724	613	485	574	181	691	492

5 Tabla 5: Medias y coeficientes de variación de la señal en bruto (mE) de los controles

		Señal en bruto media	CV
Control Normal		1163	16,7 %
Control de FMWH	CI	962	20,0 %
Control de FMWH	CII	821	20,7 %
Control de FMWH	C3	700	20,8 %
Control de FMWH	C4	560	20,5 %
Control de rivaroxabán	C1	639	20,0 %
Control de rivaroxabán	C2	187	14,7 %
Control de Orgaran	C1	791	19,7 %

ES 2 725 426 T3

Control de Orgaran	C2	556	21,6 %
--------------------	----	-----	--------

Esto explica la necesidad de por qué se requiere una calibración en primer lugar. Aunque los cuatro centros aplicaron el mismo lote de reactivos, se determinaron CV de alrededor del 20 % para los análisis de los mismos controles, simplemente debido a las diferencias entre los instrumentos aplicados en los centros.

5 Los resultados para diferentes calibraciones y laboratorios se muestran en las Fig. 2 a 5. La Fig. 2 muestra curvas de calibración para los 4 laboratorios para la heparina, la Fig. 3 para el rivaroxabán y la Fig. 4 para Orgaran. La Fig. 5 muestra las curvas de calibración universales establecidas en los 4 laboratorios.

10 Tabla 6: Curvas de regresión y valores de R² para las diferentes calibraciones que se muestran en las Fig. 2 a 5

Laboratorio	Calibración	Curva de regresión (x: señal en bruto)	R ²
Laboratorio A	Heparina	-1,7441n(x) + 12,083	0,9981
Laboratorio A	Rivaroxabán	0,892690309e ^{-0,006300096x}	0,998984101
Laboratorio A	Orgaran	0,000002228x ² - 0,005216221x + 3,045990443	0,994439120
Laboratorio A	Unitest	0,000233896x ² - 0,592434149x + 463,666010062	0,997898826
Laboratorio B	Heparina	0,000001496x ² - 0,005139085x + 4,344124193	0,998464567
Laboratorio B	Rivaroxabán	0,851889038e ^{-0,004416733x}	0,999851520
Laboratorio B	Orgaran	0,000001172x ² - 0,004072431x + 3,505349835	0,998817817
Laboratorio B	Unitest	0,000149639x ² - 0,513908541x + 534,412419251	0,998464567
Laboratorio C	Heparina	0,000002760x ² - 0,006673716x + 3,951469422	0,999147758
Laboratorio C	Rivaroxabán	0,901449676e ^{-0,006537153x}	0,999769218
Laboratorio C	Orgaran	0,000002495x ² - 0,005857423x + 3,401949500	0,998193391
Laboratorio C	Unitest	0,000276032x ² - 0,667371609x + 495,146942207	0,999147758
Laboratorio D	Heparina	0,000002961x ² - 0,006976441x + 4,001491080	0,999525076
Laboratorio D	Rivaroxabán	1,025044113e ^{-0,006971051x}	0,999108005
Laboratorio D	Orgaran	0,000002852x ² - 0,006224104x + 3,387947938	0,996263341
Laboratorio D	Unitest	0,000296081x ² - 0,697644110x + 500,149107956	0,999525076

Tabla 7: Determinadas concentraciones de anticoagulantes

		Control Normal	Control de LMWH CI	Control de LMWH CII	Control de LMWH C3	Control de LMWH C4	Control de rivar. C1	Control de rivar. C2	Control de Orgaran C1	Control de Orgaran C2
valor diana		0	0,25	0,48	0,8	1,2	0,09	0,3	0,48	1
centro	día									
A	1	-0,12	0,26	0,54	0,82	1,27	0,03	0,29	0,44	1,00
A	1	-0,11	0,25	0,58	0,92	1,31	0,02	0,30	0,45	1,02
A	2	-0,03	0,34	0,61	0,89	1,32	0,03	0,30	0,47	1,10
A	2	-0,09	0,32	0,53	0,84	1,24	0,03	0,31	0,49	1,08
A	3	-0,10	0,27	0,55	0,86	1,27	0,02	0,31	0,47	1,11
A	3	-0,09	0,27	0,53	0,86	1,25	0,02	0,28	0,46	1,08
B	1	-0,01	0,26	0,47	0,79	1,44	0,02	0,30	0,48	1,06
B	1	-0,01	0,18	0,48	0,81	1,30	0,02	0,30	0,54	1,15
B	2	0,00	0,18	0,53	0,88	1,37	0,02	0,31	0,50	1,10
B	2	0,04	0,23	0,51	0,80	1,31	0,02	0,30	0,57	1,04

ES 2 725 426 T3

B	3	0,01	0,18	0,48	0,81	1,23	0,02	0,32	0,53	1,10
B	3	0,02	0,23	0,48	0,83	1,29	0,02	0,30	0,48	1,10
C	1	-0,03	0,26	0,84	1,05	1,23	0,02	0,32	0,48	1,11
C	1	-0,03	0,20	0,77	0,82	1,32	0,02	0,31	0,52	1,12
C	2	-0,02	0,23	0,47	0,83	1,27	0,02	0,32	0,54	1,09
C	2	-0,02	0,27	0,51	0,86	1,31	0,02	0,31	0,53	1,09
C	3	-0,02	0,24	0,51	0,88	1,26	0,02	0,32	0,48	1,09
C	3	-0,02	0,24	0,52	0,80	1,24	0,02	0,30	0,47	1,04
D	1	-0,04	0,27	0,51	0,84	1,29	0,02	0,29	0,47	1,03
D	1	-0,03	0,28	0,51	0,84	1,32	0,02	0,30	0,46	1,07
D	2	-0,04	0,23	0,49	0,86	1,34	0,03	0,30	0,46	1,07
D	2	-0,03	0,23	0,50	0,84	1,31	0,02	0,30	0,42	1,03
D	3	-0,04	0,23	0,47	0,83	1,29	0,02	0,29	0,45	1,00
D	3	-0,04	0,27	0,50	0,84	1,32	0,02	0,29	0,45	1,02
media		-0,04	0,25	0,54	0,85	1,29	0,02	0,30	0,48	1,07
CV			16,3 %	16,7 %	6,1 %	3,7 %	14,9 %	3,5 %	7,5 %	3,8 %
CV promedio		9,0 %								

El análisis muestra los resultados individuales, los valores medios y los CV de las 24 mediciones que se realizaron para cada control (4 laboratorios, 3 días, 2 determinaciones cada uno).

- 5 El análisis también revela un problema de la estrategia clásica para calibrar los fármacos individuales: las muestras sin anticoagulante se pueden volver negativas fácilmente, de lo que típicamente se informa como 0 o <0,05 aXa U/ml (por ejemplo). Aun así, esto puede causar problemas matemáticos cuando, por ejemplo, los resultados de los ensayos clínicos se analizan estadísticamente.

10 Tabla 8: Resultados de las mediciones utilizando la calibración universal

		Control Normal	Control de LMWH	Control de LMWH	Control de LMWH	Control de LMWH	Control de rivar.	Control de rivar.	Control de Orgaran	Control de Orgaran
			CI	CII	C3	C4	C1	C2	C1	C2
Unidad		XU	XU	XU	XU	XU	XU	XU	XU	XU
centro	día									
A	1	95	124	151	181	228	206	364	157	226
A	1	96	123	155	191	232	198	367	159	229
A	2	101	132	158	189	233	210	368	162	239
A	2	97	129	150	183	226	204	370	164	236
A	3	97	125	152	186	228	197	371	162	240
A	3	97	125	151	185	226	197	363	161	236
B	1	99	126	147	179	244	214	422	155	227
B	1	99	118	149	181	230	202	422	162	238
B	2	100	118	153	188	237	190	425	157	232
B	2	104	124	151	180	231	205	422	166	225
B	3	102	118	148	181	223	206	427	160	232
B	3	102	123	148	183	229	212	423	155	232
C	1	97	126	184	205	223	205	397	159	232

ES 2 725 426 T3

C	1	97	120	177	183	232	206	393	163	233
C	2	98	123	147	183	227	210	395	165	229
C	2	98	127	151	186	231	209	395	163	229
C	3	98	124	151	188	226	202	396	158	230
C	3	98	124	152	180	224	202	391	157	224
D	1	96	127	151	184	229	198	384	162	230
D	1	97	128	151	184	232	201	385	161	235
D	2	96	123	149	186	234	215	386	161	235
D	2	97	123	150	184	231	195	385	156	230
D	3	95	123	147	183	229	190	385	159	227
D	3	96	127	150	184	232	197	384	159	229
media		98,02	124,07	153,08	184,78	229,76	203,04	392,51	160,09	231,47
CV		2,2 %	2,7 %	5,8 %	2,8 %	2,0 %	3,4 %	5,3 %	1,9 %	1,9 %
CV promedio		3,2 %								

El análisis muestra CV significativamente mejores para el uso de calibraciones universales en comparación con la expresión de los resultados por la concentración de anticoagulante (técnica anterior). Asimismo, no se produce el problema de la expresión de resultados sin actividad anticoagulante.

5

Ejemplo 2: Determinación de la actividad anticoagulante basada en la calibración universal

Tabla 9: Curvas de calibración de los 4 laboratorios para los tres anticoagulantes. Las curvas de calibración se muestran como datos en bruto (delta-E = dE) y se expresan en XU (calibración universal = Unitest).

10

		Calibrador de heparina					Calibrador de rivar.			Calibrador de Orgaran				
		Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5
	Diana	0	0,36	0,76	1,21	1,65	0	0,25	0,49	0	0,4	0,8	1,2	1,6
Centro		aXa U/ml					µg/ml			Orgaran U/ml				
A	dE	1036	827	656	501	405	1076	220	79	1070	774	552	423	333
A	XU	101	134	176	226	262	97	344	418	98	145	208	255	292
B	dE	1492	1196	974	779	654	1527	288	117	1556	1151	882	708	563
B	XU	101	134	176	225	262	99	399	477	97	141	198	246	293
C	dE	1028	818	654	518	421	1040	205	86	1040	772	587	463	370
C	XU	101	134	177	224	263	100	370	440	100	144	198	245	286
D	dE	981	789	632	509	409	992	218	93	1006	737	543	437	347
D	XU	101	134	178	222	264	99	362	438	98	147	209	252	294
	XU-pro medio	101	134	176	224	263	99	369	443	98	144	203	249	291
		aXa U/ml					µg/ml			Orgaran U/ml				

Sobre la base de los valores medios de XU determinados para los calibradores en los cuatro centros, se calculó una curva de calibración para determinar la actividad anticoagulante a partir del valor de XU; véase la Fig. 6.

15 Tabla 10: Curvas de regresión y valores de R² para las calibraciones para calcular la concentración de anticoagulante a partir de los valores de XU calibrados universales

Calibración	Curva de regresión (x: valor de XU)	R ²
Heparina	0,01x - 1,0004	0,999

ES 2 725 426 T3

Rivaroxabán	$5,394066 * (10^{-12}) * x ^ 4,147251$	0,999834
Orgaran	$0,008113 * x - 0,800487$	0,996813

Quando se usan estas curvas de regresión para calcular las concentraciones de anticoagulante a partir de los valores de XU, se encuentran los siguientes resultados para las muestras de LMWH (y la muestra de control sin actividad anticoagulante):

5

Tabla 11: Concentraciones de anticoagulante a partir de los valores de XU para las muestras de LMWH

laboratorio	día	Control Normal	Control de LMWH CI	Control de LMWH CII	Control de LMWH C3	Control de LMWH C4	valor diana
		0	0,25	0,48	0,8	1,2	
A	1	-0,05	0,24	0,51	0,80	1,28	
A	1	-0,04	0,22	0,55	0,91	1,32	
A	2	0,01	0,31	0,58	0,89	1,33	
A	2	-0,03	0,29	0,50	0,83	1,26	
A	3	-0,04	0,25	0,52	0,86	1,28	
A	3	-0,03	0,25	0,51	0,85	1,26	
B	1	-0,01	0,26	0,47	0,79	1,44	
B	1	-0,01	0,18	0,48	0,81	1,30	
B	2	0,00	0,18	0,53	0,88	1,37	
B	2	0,04	0,23	0,51	0,80	1,31	
B	3	0,01	0,18	0,48	0,81	1,23	
B	3	0,02	0,23	0,48	0,83	1,29	
C	1	-0,03	0,26	0,84	1,05	1,22	
C	1	-0,03	0,20	0,77	0,82	1,32	
C	2	-0,02	0,23	0,47	0,83	1,27	
C	2	-0,02	0,27	0,51	0,86	1,31	
C	3	-0,02	0,24	0,51	0,88	1,26	
C	3	-0,02	0,24	0,52	0,80	1,24	
D	1	-0,04	0,27	0,51	0,84	1,29	
D	1	-0,03	0,28	0,51	0,84	1,32	
D	2	-0,04	0,23	0,49	0,86	1,34	
D	2	-0,03	0,23	0,50	0,84	1,30	
D	3	-0,05	0,23	0,47	0,83	1,29	
D	3	-0,04	0,27	0,50	0,84	1,32	
		-0,02	0,24	0,53	0,85	1,30	media
			14,2 %	16,8 %	6,1 %	3,6 %	CV

Quando se usan estas curvas de regresión para calcular las concentraciones de anticoagulante a partir de los valores de XU, se encuentran los siguientes resultados para las muestras de rivaroxabán (y la muestra de control sin actividad anticoagulante):

10

Tabla 12: Concentraciones de anticoagulante a partir de los valores de XU para las muestras de rivaroxabán

laboratorio	día	Control Normal	Control de rivar. C1	Control de rivar. C2	valor diana
		0	0,09	0,3	
A	1	0,00	0,02	0,23	
A	1	0,00	0,02	0,23	
A	2	0,00	0,02	0,24	
A	2	0,00	0,02	0,24	
A	3	0,00	0,02	0,24	
A	3	0,00	0,02	0,22	
B	1	0,00	0,03	0,42	
B	1	0,00	0,02	0,42	
B	2	0,00	0,02	0,43	
B	2	0,00	0,02	0,42	
B	3	0,00	0,02	0,44	
B	3	0,00	0,02	0,42	
C	1	0,00	0,02	0,32	
C	1	0,00	0,02	0,31	
C	2	0,00	0,02	0,32	
C	2	0,00	0,02	0,32	
C	3	0,00	0,02	0,32	
C	3	0,00	0,02	0,30	
D	1	0,00	0,02	0,28	
D	1	0,00	0,02	0,29	
D	2	0,00	0,03	0,29	
D	2	0,00	0,02	0,29	
D	3	0,00	0,02	0,28	
D	3	0,00	0,02	0,28	
		0,00	0,02	0,31	media
			13,8 %	22,5 %	CV

Cuando se usan estas curvas de regresión para calcular las concentraciones de anticoagulante a partir de los valores de XU, se encuentran los siguientes resultados para las muestras de Orgaran (y la muestra de control sin actividad anticoagulante):

5

Tabla 12: Concentraciones de anticoagulante a partir de los valores de XU para las muestras de Orgaran

laboratorio	día	Control Normal	Control de Orgaran C1	Control de Orgaran C2	valor diana
		0	0,48	1	
A	1	-0,03	0,48	1,04	
A	1	-0,02	0,49	1,06	

ES 2 725 426 T3

A	2	0,02	0,51	1,14	
A	2	-0,01	0,53	1,12	
A	3	-0,02	0,51	1,15	
A	3	-0,01	0,50	1,12	
B	1	0,01	0,45	1,04	
B	1	0,00	0,52	1,13	
B	2	0,01	0,47	1,08	
B	2	0,04	0,54	1,02	
B	3	0,02	0,50	1,08	
B	3	0,02	0,46	1,08	
C	1	-0,01	0,49	1,08	
C	1	-0,01	0,52	1,09	
C	2	-0,01	0,54	1,06	
C	2	0,00	0,53	1,06	
C	3	0,00	0,48	1,07	
C	3	-0,01	0,47	1,02	
D	1	-0,02	0,52	1,07	
D	1	-0,02	0,51	1,10	
D	2	-0,02	0,50	1,11	
D	2	-0,01	0,47	1,06	
D	3	-0,03	0,49	1,04	
D	3	-0,02	0,49	1,05	
		-0,01	0,50	1,08	media
			4,9 %	3,3 %	CV

Tabla 13: Comparación de los valores medios y CV para los controles determinados por medio de las calibraciones individuales y por medio de la calibración universal:

		valor diana	Calibración individual		Calibración universal		
Control Normal	Principio activo	0	-0,04		-0,02		aXa U/ml
Control de LMWH	CI	0,25	0,25	16,3 %	0,24	14,2 %	aXa U/ml
Control de LMWH	CII	0,48	0,54	16,7 %	0,53	16,8 %	aXa U/ml
Control de LMWH	C3	0,8	0,85	6,1 %	0,85	6,1 %	aXa U/ml
Control de LMWH	C4	1,2	1,29	3,7 %	1,30	3,6 %	aXa U/ml
Control Normal	Principio activo	0	-0,04		0,00		µg Rivaroxabán/ml
Control de rivaroxabán	C1	0,09	0,02	14,9 %	0,02	13,8 %	µg Rivaroxabán/ml
Control de rivaroxabán	C2	0,3	0,30	3,5 %	0,31	22,5 %	µg Rivaroxabán/ml

Control Normal	Principio activo	0	0,00		-0,01		U Orgaran/ml
Control de Orgaran	C1	0,48	0,48	7,5 %	0,50	4,9 %	U Orgaran/ml
Control de Orgaran	C2	1	1,07	3,8 %	1,08	3,3 %	U Orgaran/ml

La Tabla 13 muestra que los datos de concentración de fármaco derivados de la calibración universal son muy similares a los datos derivados de la calibración individual.

- 5 El CV alto del control alto de rivaroxabán se puede explicar por el hecho de que los valores de XU se extrapolaron para este punto de datos, ya que el calibrador más alto para la calibración de XU tuvo solo 260 XU, mientras que el control alto de rivaroxabán tuvo aproximadamente 400 XU. En una situación de la vida real, los valores superiores al calibrante más alto se expresarían como >260 XU (por ejemplo) y se permitiría una extrapolación limitada (por ejemplo, hasta valores de un 110 % del calibrante más alto).
- 10 En esencia, la calibración universal permite monitorizar varios anticoagulantes diferentes dirigidos contra el factor Xa usando una única curva de calibración/un conjunto de controles/un procedimiento de prueba de competencia/un PNT, en lugar del estado actual de la técnica con varias curvas de calibración, varios conjuntos de controles, PNT. El acuerdo entre diferentes días y centros fue igual de bueno o mejor con la calibración universal que usando las calibraciones individuales. También es posible finalmente transformar los resultados de la calibración universal en las concentraciones reales del fármaco. En conclusión, este procedimiento tiene el potencial de simplificar significativamente la monitorización de los inhibidores del factor Xa, reducir los costes y mejorar los flujos de trabajo, al mismo tiempo que reduce los riesgos y mejora la flexibilidad del procedimiento de diagnóstico.
- 15
- 20 Se están introduciendo constantemente nuevos anticoagulantes en la práctica clínica. Una de las ventajas del procedimiento de la invención es que los nuevos anticoagulantes dirigidos contra FXa y/o FIIa se pueden someter a prueba fácilmente usando el ensayo de la invención sin una modificación de la prueba o el procedimiento de calibración. Por otra parte, también para el procedimiento de calibración se pueden aplicar anticoagulantes u otros inhibidores del factor IIa y/o factor Xa de origen sintético o natural.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende:
- 5 (a) medir una primera actividad del factor Xa en una muestra de prueba de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) medir una segunda actividad del factor Xa en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante;
- 10 (c) calcular un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba en base a la primera y la segunda actividades del factor Xa medidas;
- (d) comparar dicho parámetro universal para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes para determinar la actividad anticoagulante,
- 15 en el que dicho cálculo de un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprende comparar la primera actividad del factor Xa medida con la segunda actividad del factor Xa medida de la al menos una muestra de calibrador, en el que un parámetro universal de calibración para la actividad del factor Xa se ha asignado a dicha segunda actividad del factor Xa medida, y derivar el parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba de fluido corporal de dicho parámetro universal de calibración,
- 20 en el que al menos las etapas c) y d) se llevan a cabo mediante un algoritmo implementado por ordenador.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos primer y segundo anticoagulantes son diferentes.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha medición de dicha actividad del factor Xa en una muestra comprende:
- 30 (a) poner en contacto dicha muestra con reactivos que comprenden al menos factor Xa y un sustrato de factor Xa en condiciones que permiten la conversión enzimática del sustrato, por lo que una propiedad física o química del sustrato se cambia de una manera detectable; y
- 35 (b) detectar la extensión del cambio de la propiedad física o química del sustrato; y
- (c) comparar dicha extensión del cambio con una referencia, por lo que se mide la cantidad de la actividad del factor Xa en la muestra.
- 40 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha propiedad física o química se selecciona del grupo que consiste en: propiedades de fluorescencia, propiedades ópticas y propiedades electroquímicas.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto es un mamífero y, preferentemente, un ser humano.
- 45 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra de prueba de fluido corporal es una muestra de orina, una muestra de sangre total o una muestra de plasma sanguíneo.
- 50 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el parámetro universal de calibración (P) se calcula mediante el siguiente cálculo: $P = 100 + (\text{factor} * \text{cantidad o actividad del anticoagulante usado para la calibración})$.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho primer y/o segundo anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en: heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparina no fraccionada (UFH), danaparóide, rivaroxabán, un pentasacárido y apixabán.
- 55 9. Un código de programa informático incrustado de forma tangible en un procesador de datos, llevando a cabo dicho código de programa informático al menos las etapas c) y d) del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 60 10. Un sistema para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra de un sujeto que comprende:

(a) una unidad de análisis que puede medir la actividad del factor Xa en una muestra de dicho sujeto y en al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante; y

5 (b) una unidad de evaluación que comprende (i) un algoritmo implementado por ordenador que calcula un parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba basada en la primera y la segunda actividades del factor Xa medidas, y (ii) un algoritmo implementado por ordenador que compara dicho parámetro para la actividad de anticoagulación con intervalos predefinidos de actividad de
10 anticoagulación esperada para al menos tres anticoagulantes.

11. El sistema de la reivindicación 10, en el que dicho algoritmo implementado por ordenador que calcula de un parámetro universal para la actividad de anticoagulación compara la primera actividad del factor Xa medida con la segunda actividad del factor Xa medida de la al menos una muestra de calibrador, en el que un parámetro universal de calibración para la actividad del factor Xa se ha asignado a dicha segunda actividad del factor Xa
15 medida, y deriva el parámetro universal para la actividad de anticoagulación comprendida en la muestra de prueba de fluido corporal de dicho parámetro universal de calibración.

12. Un kit para determinar una actividad anticoagulante provocada por un primer anticoagulante en una muestra que comprende al menos una muestra de calibrador que comprende una actividad de anticoagulación predefinida para un segundo anticoagulante, factor Xa, un sustrato de factor Xa, y controles para dicho primer
20 anticoagulante.

Fig. 1

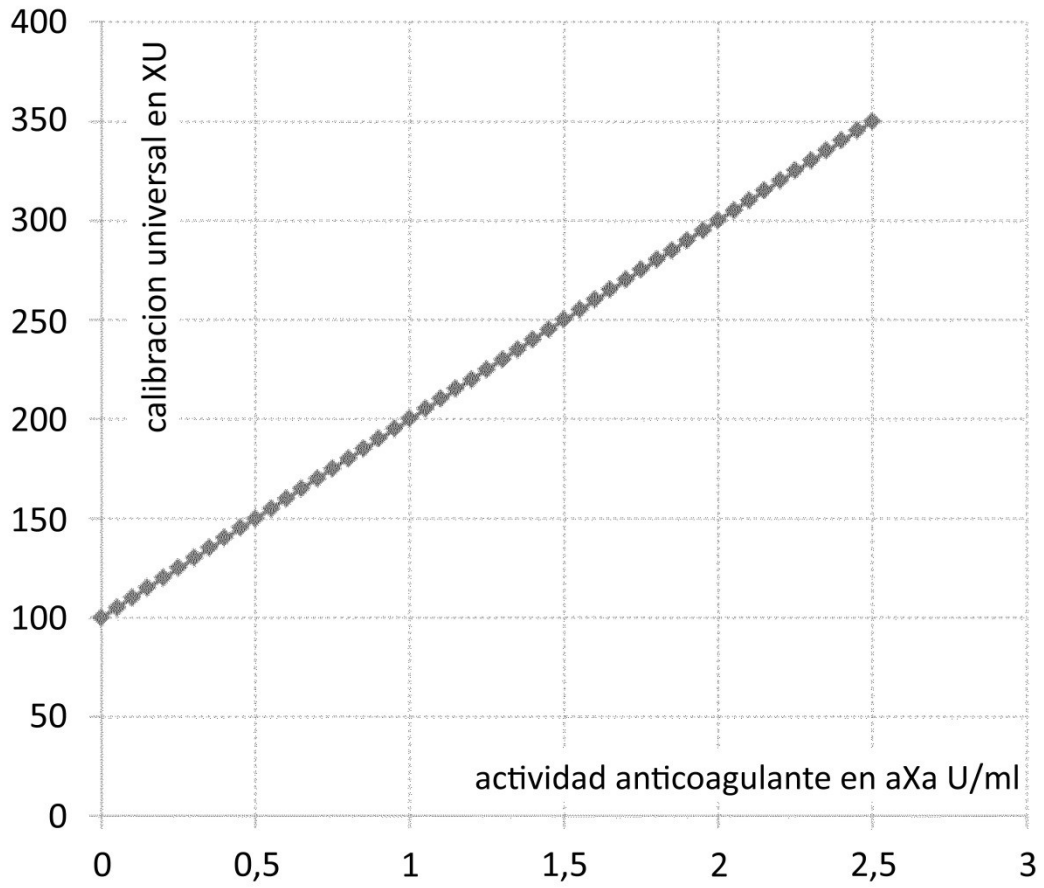


Fig. 2

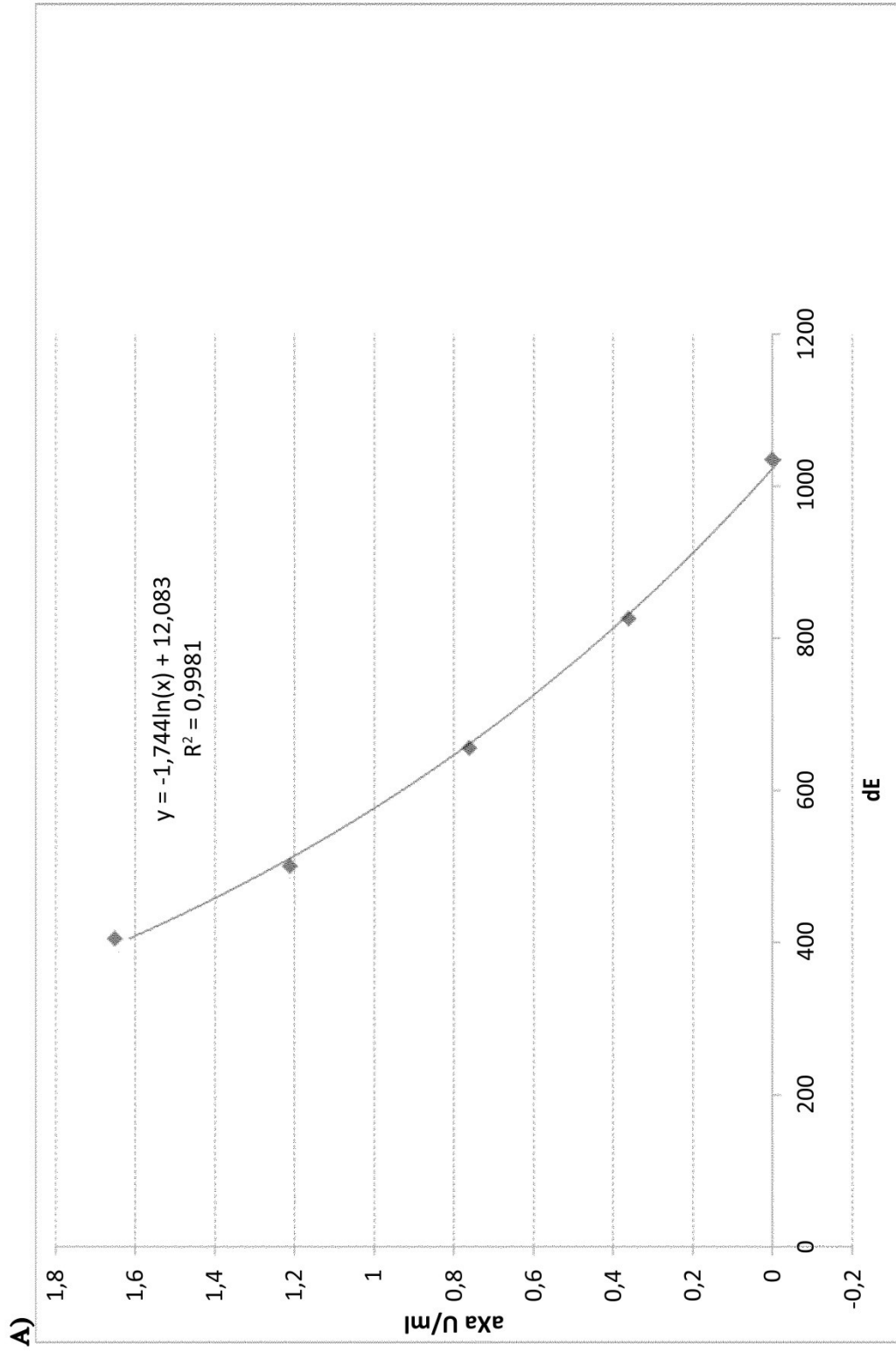


Fig. 2

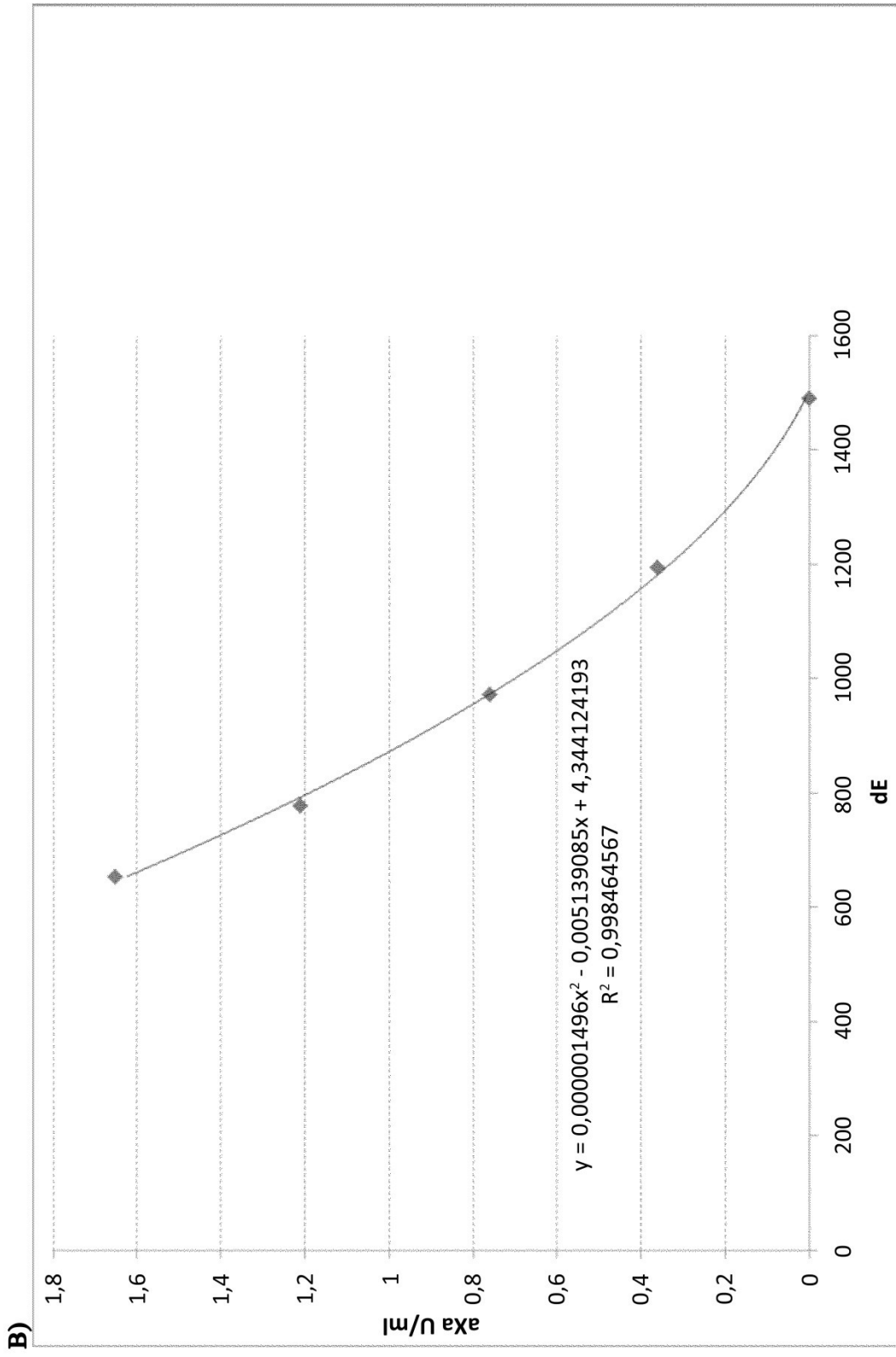


Fig. 2

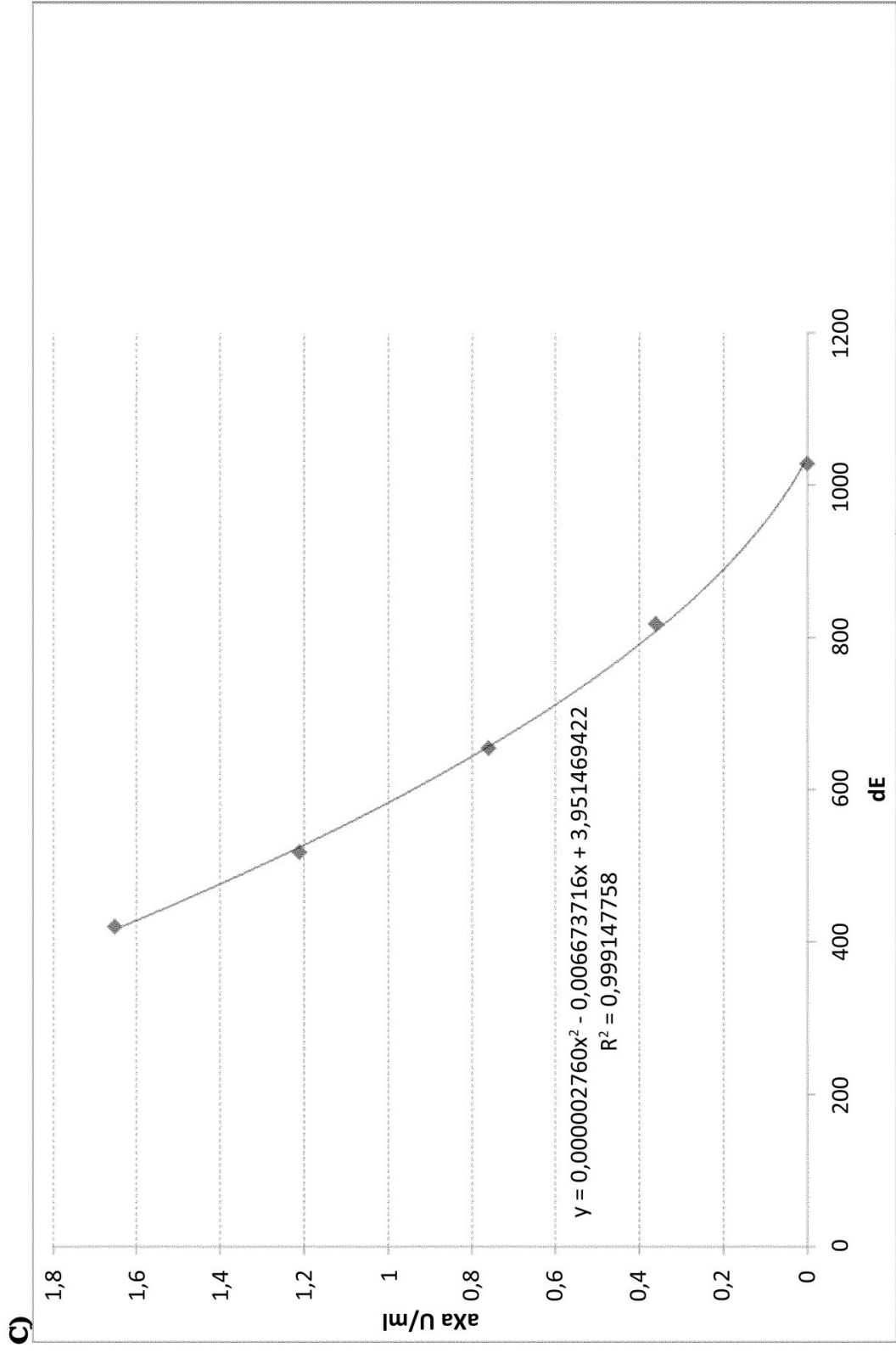


Fig. 2

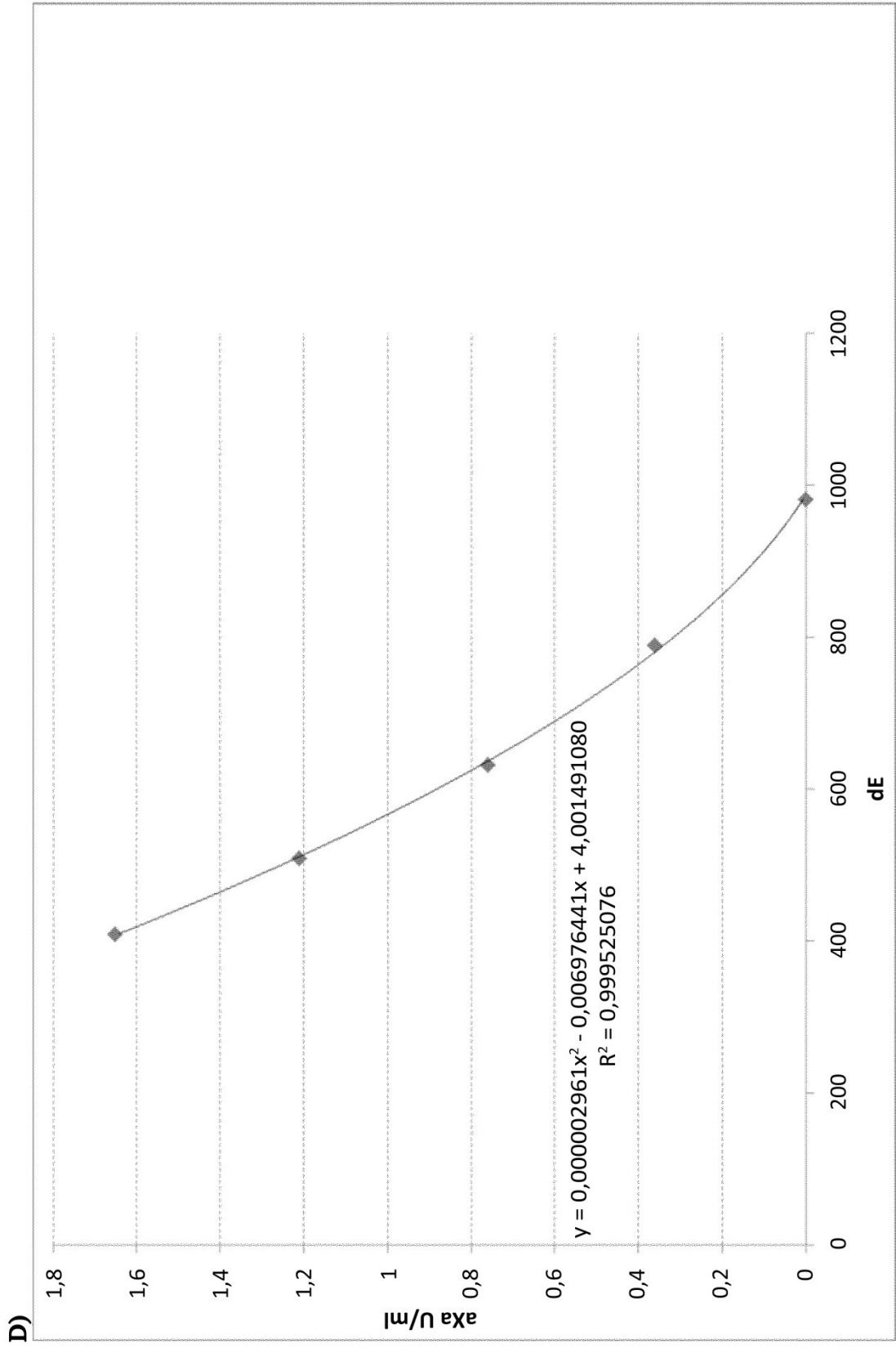


Fig. 3

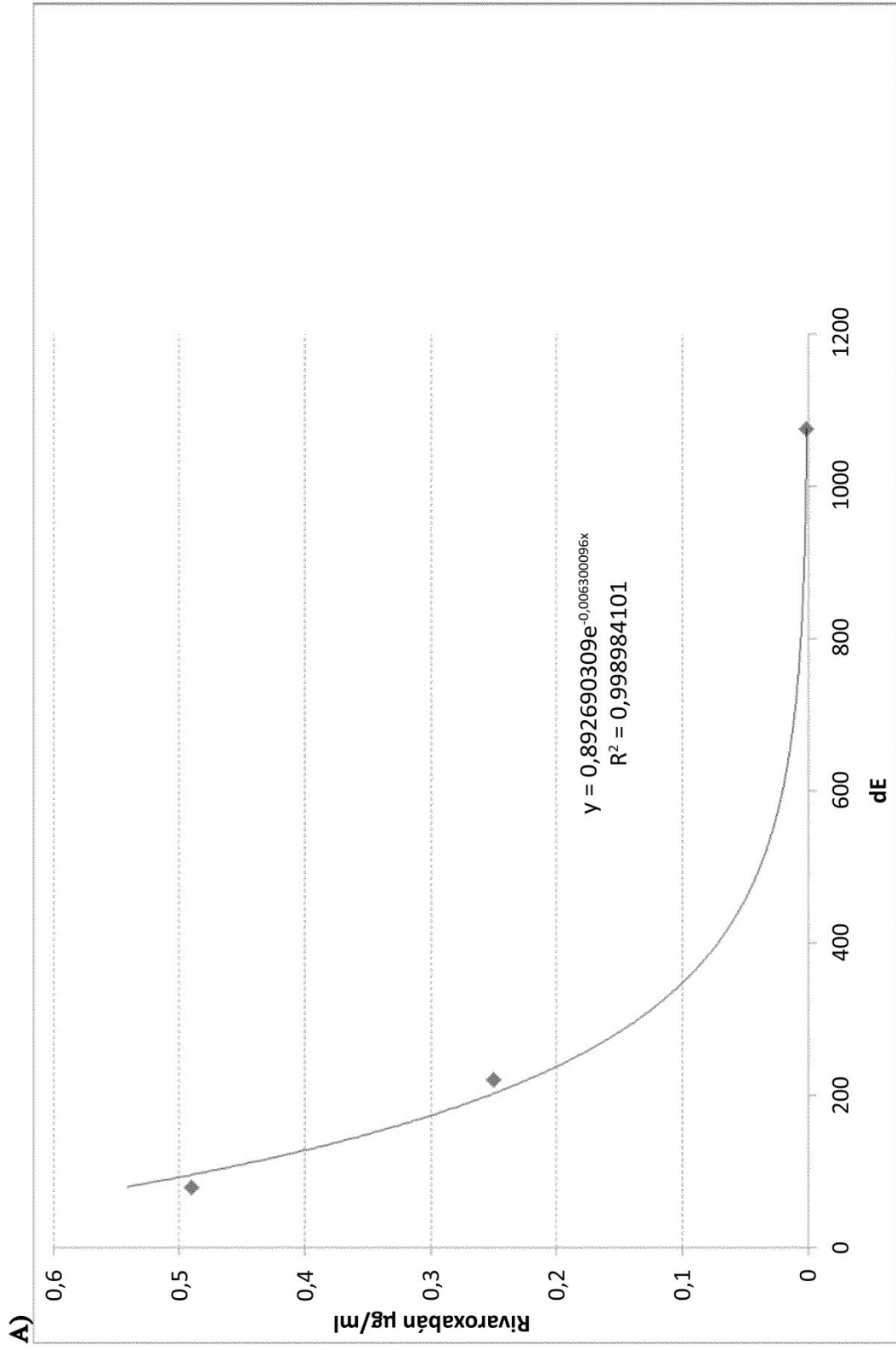


Fig. 3

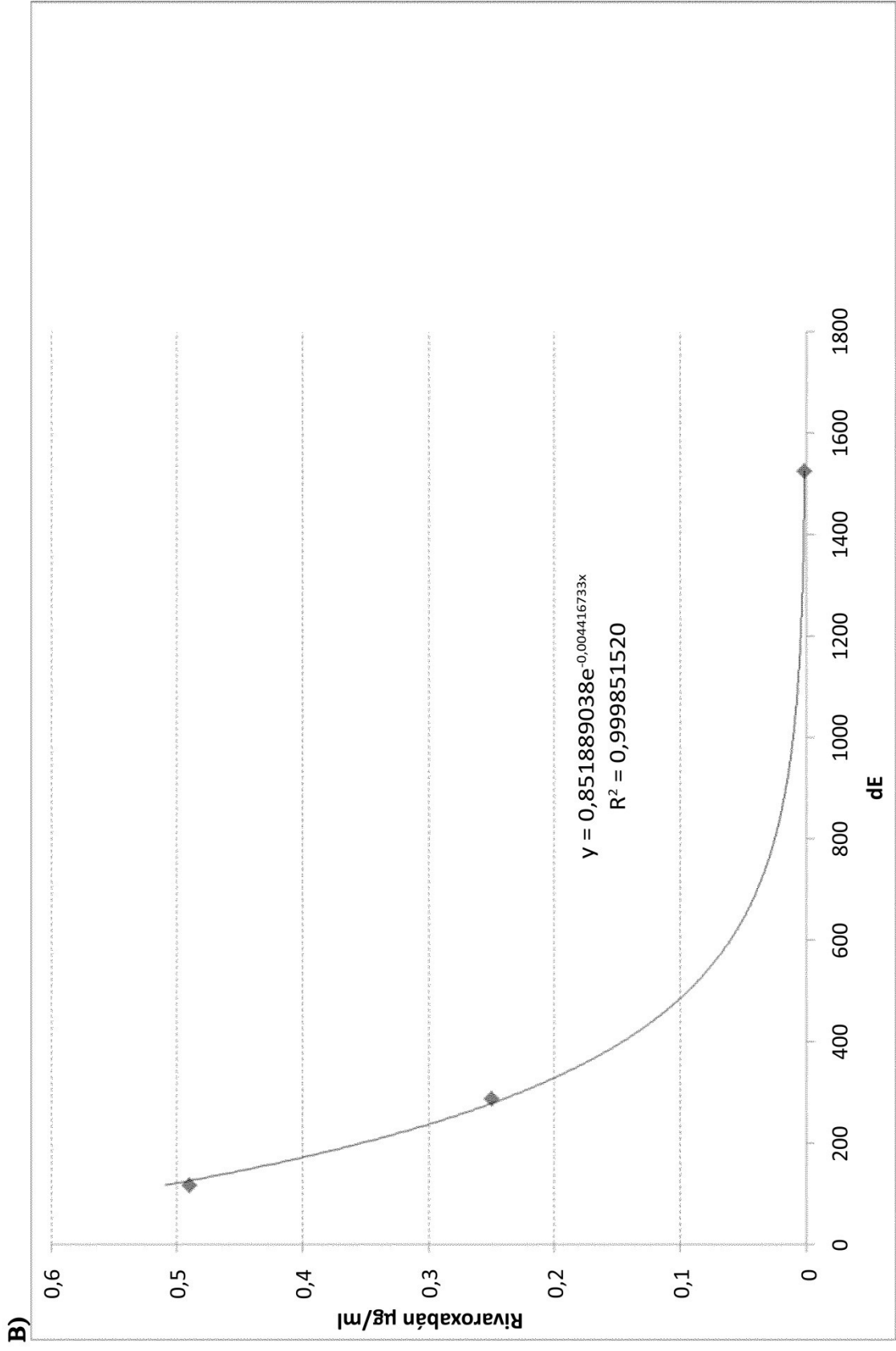


Fig. 3

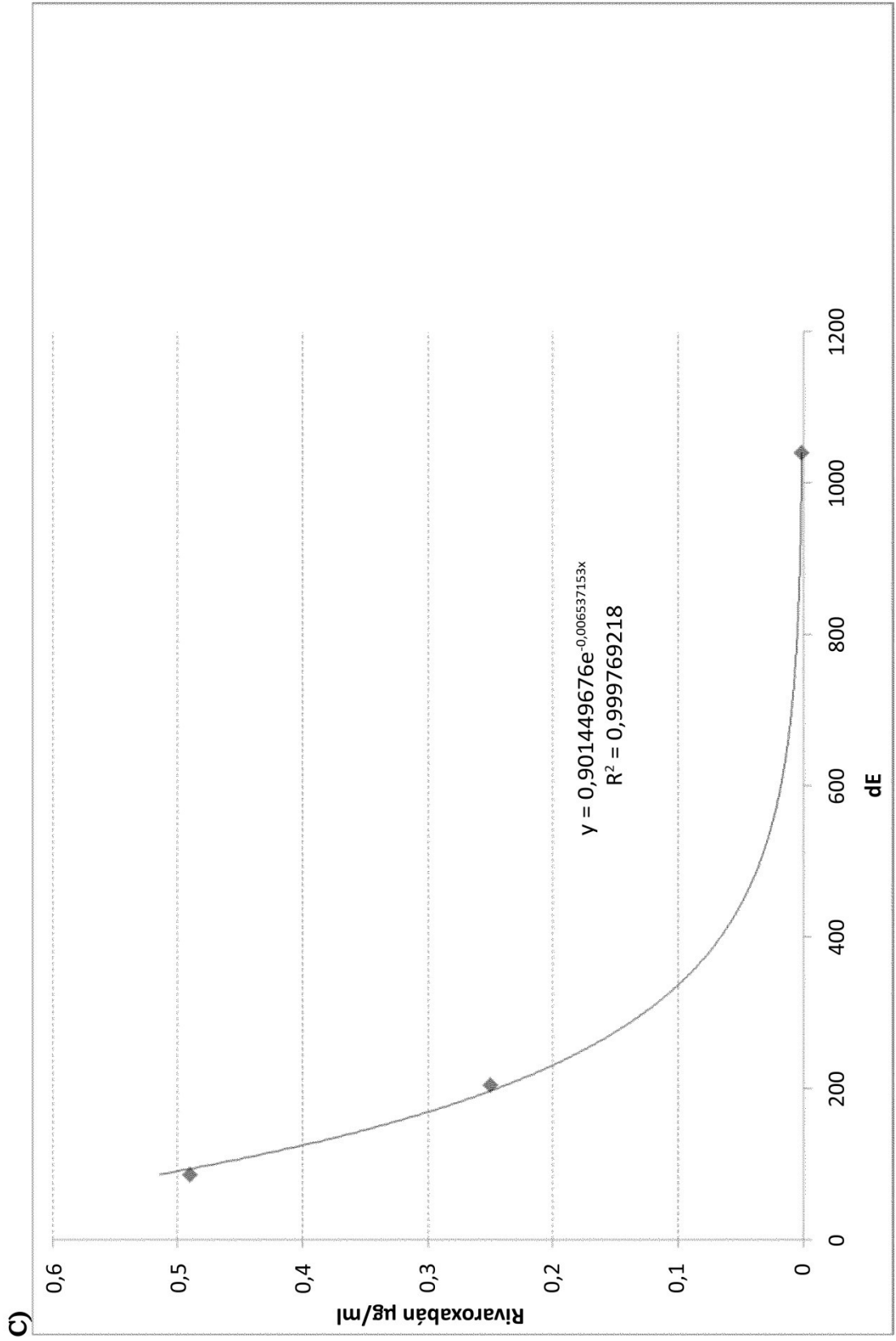


Fig. 3

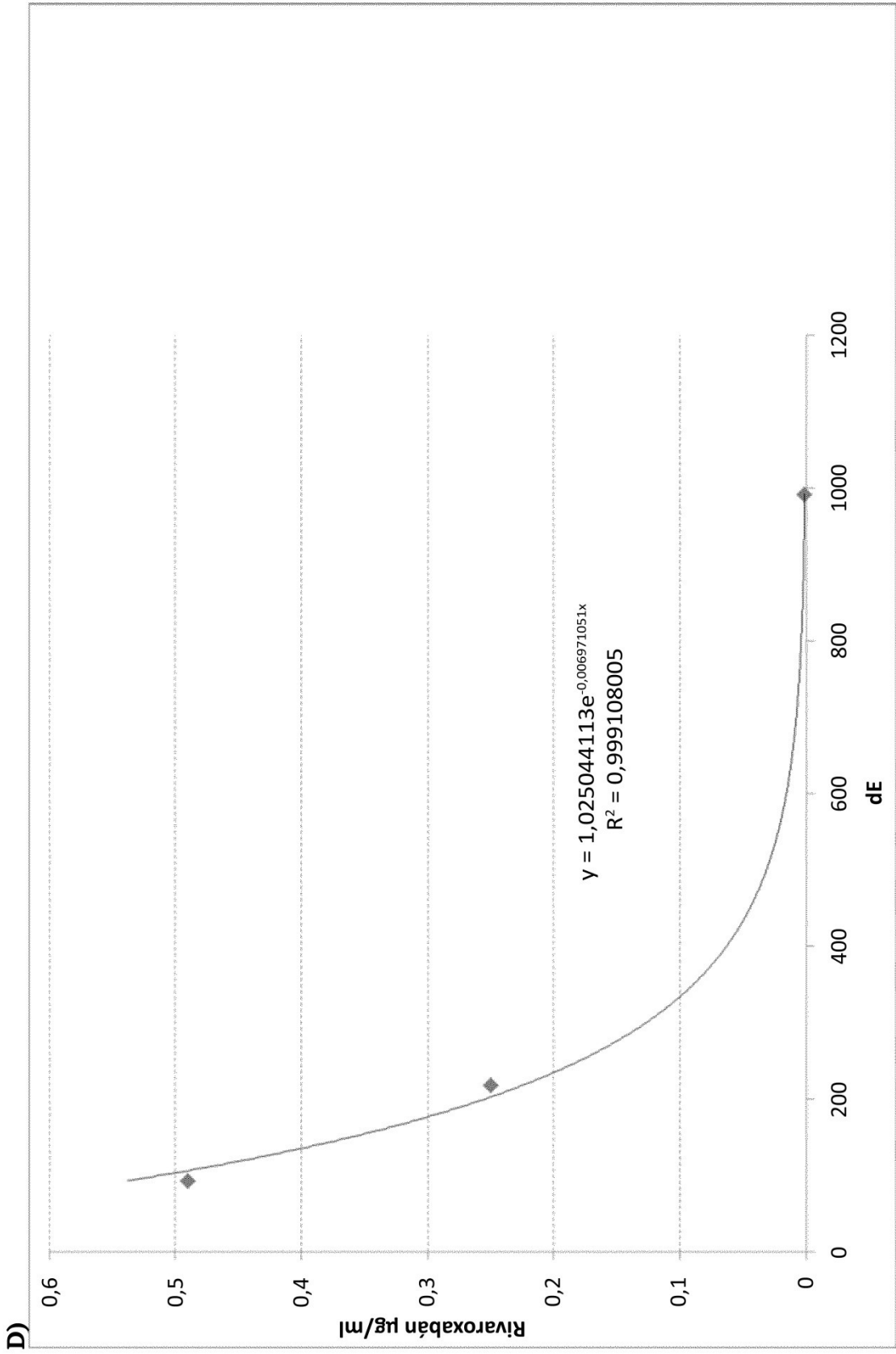


Fig. 4

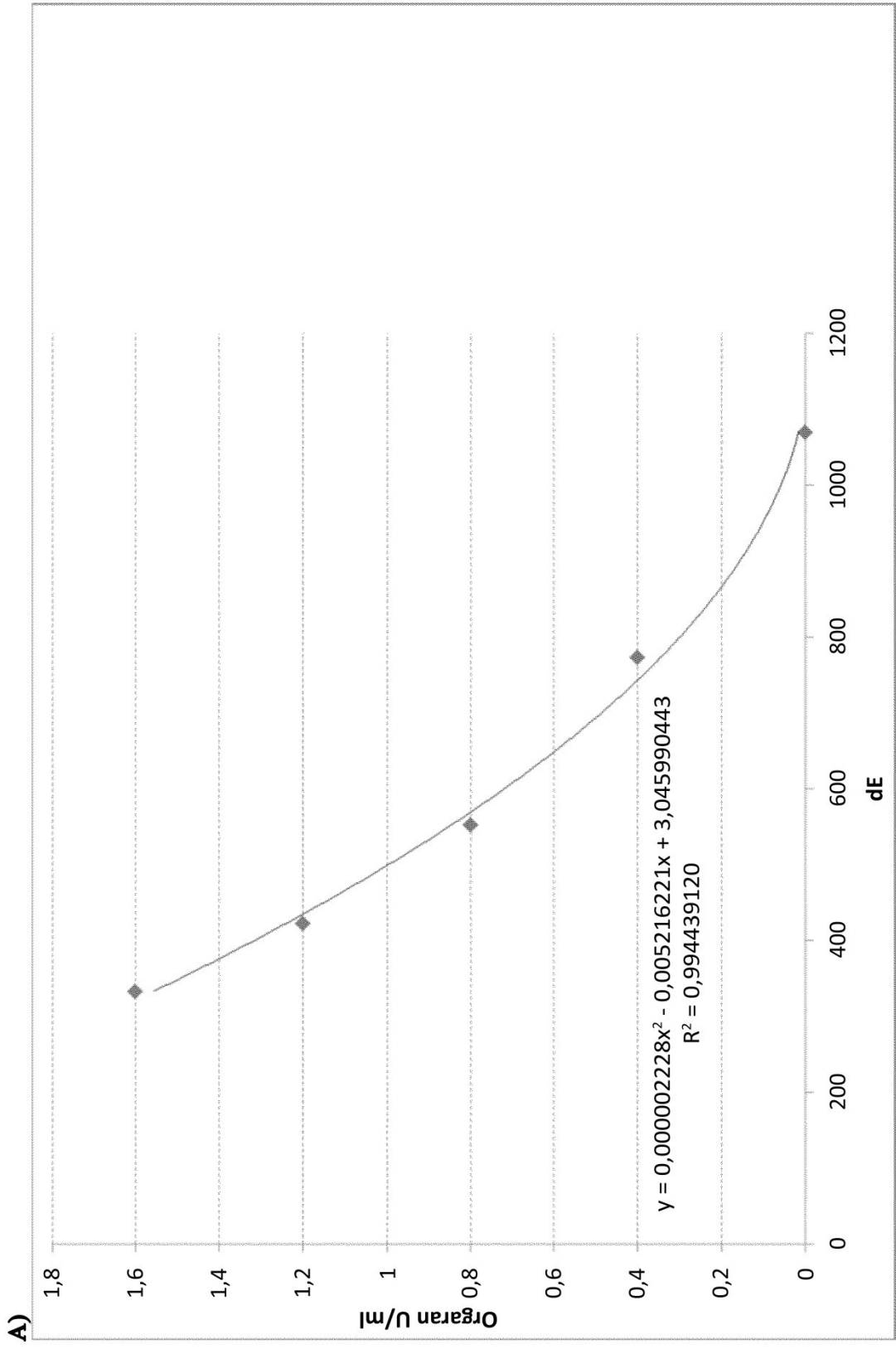


Fig. 4

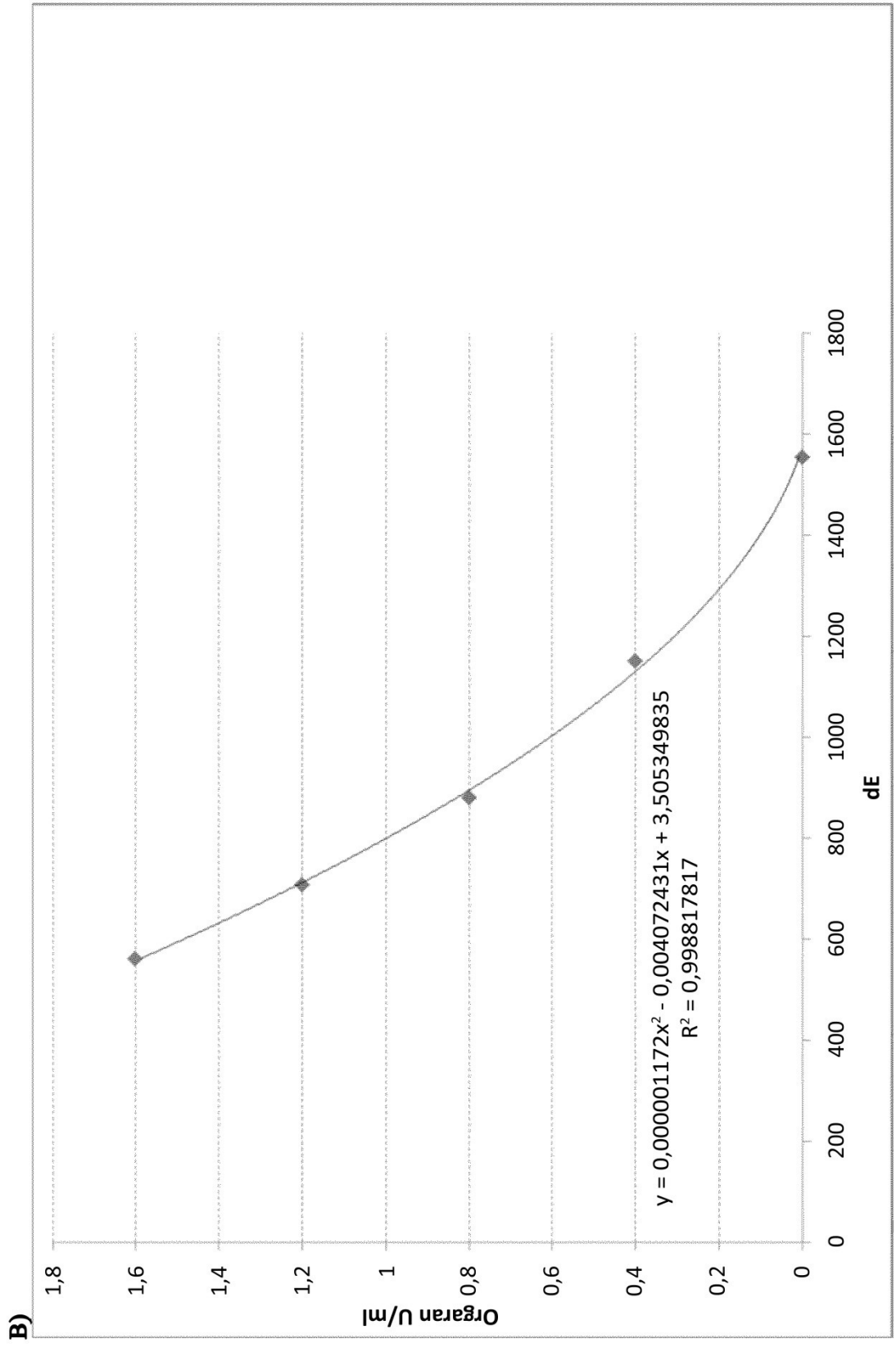


Fig. 4

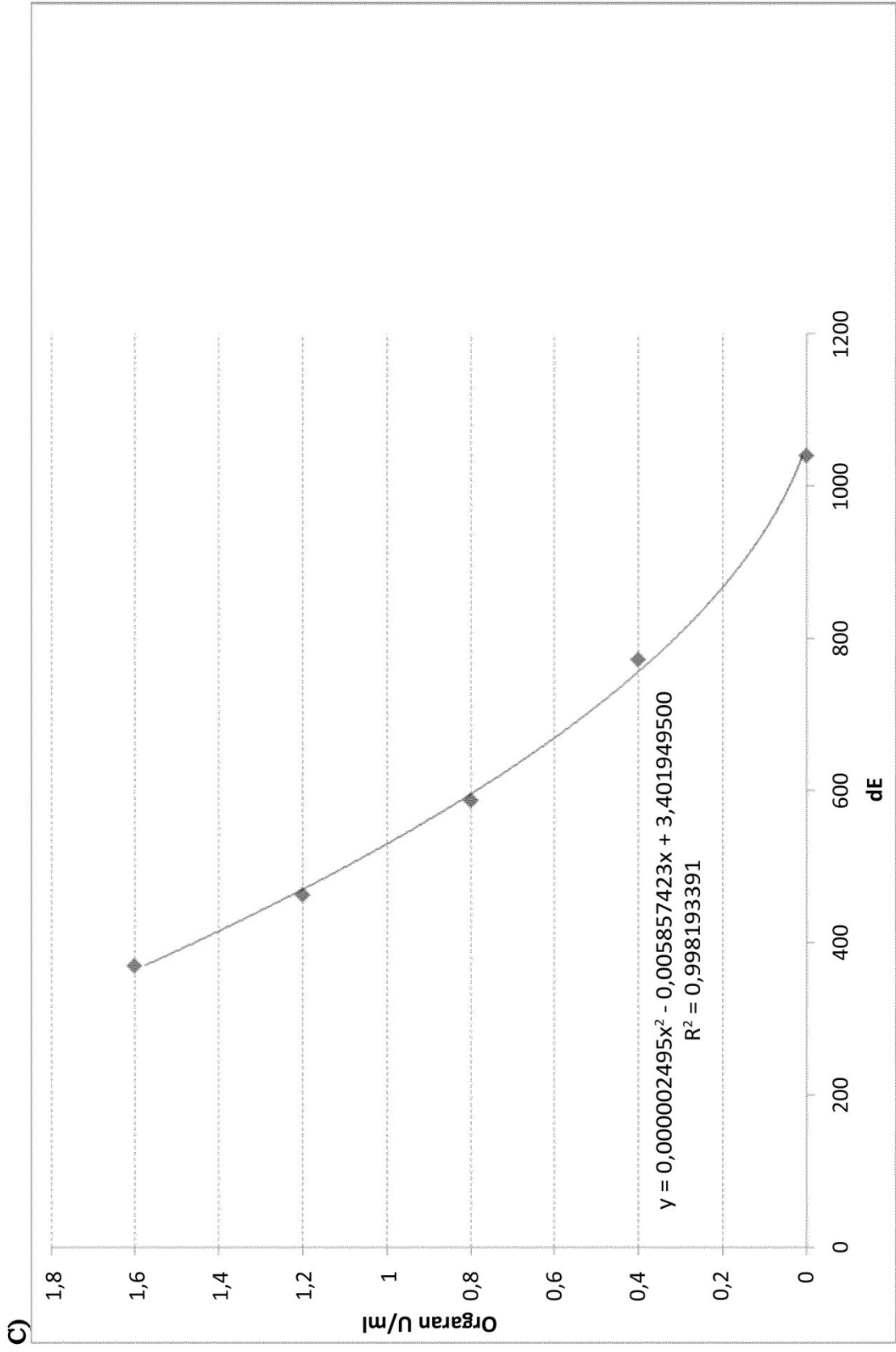


Fig. 4

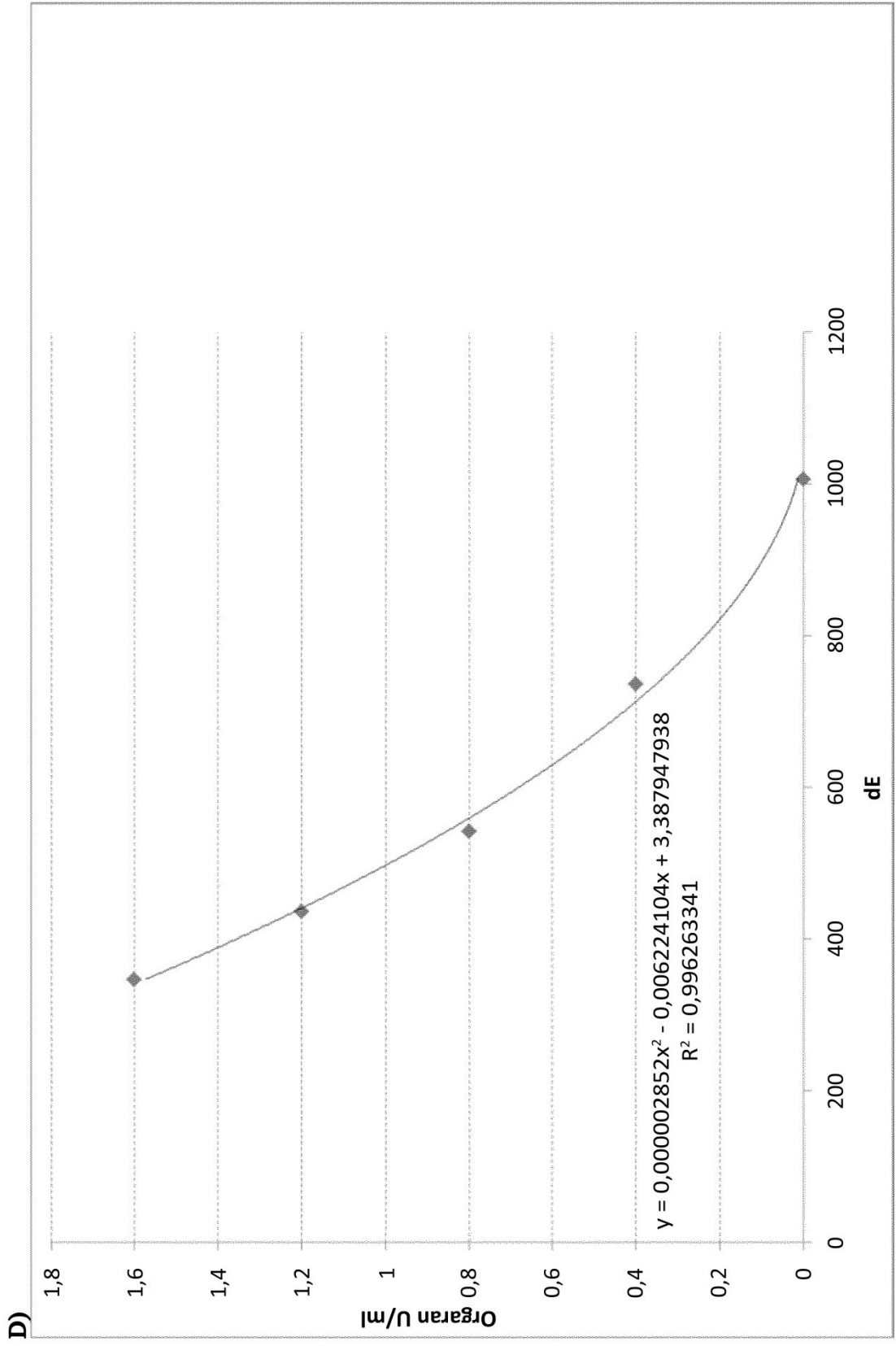


Fig. 5

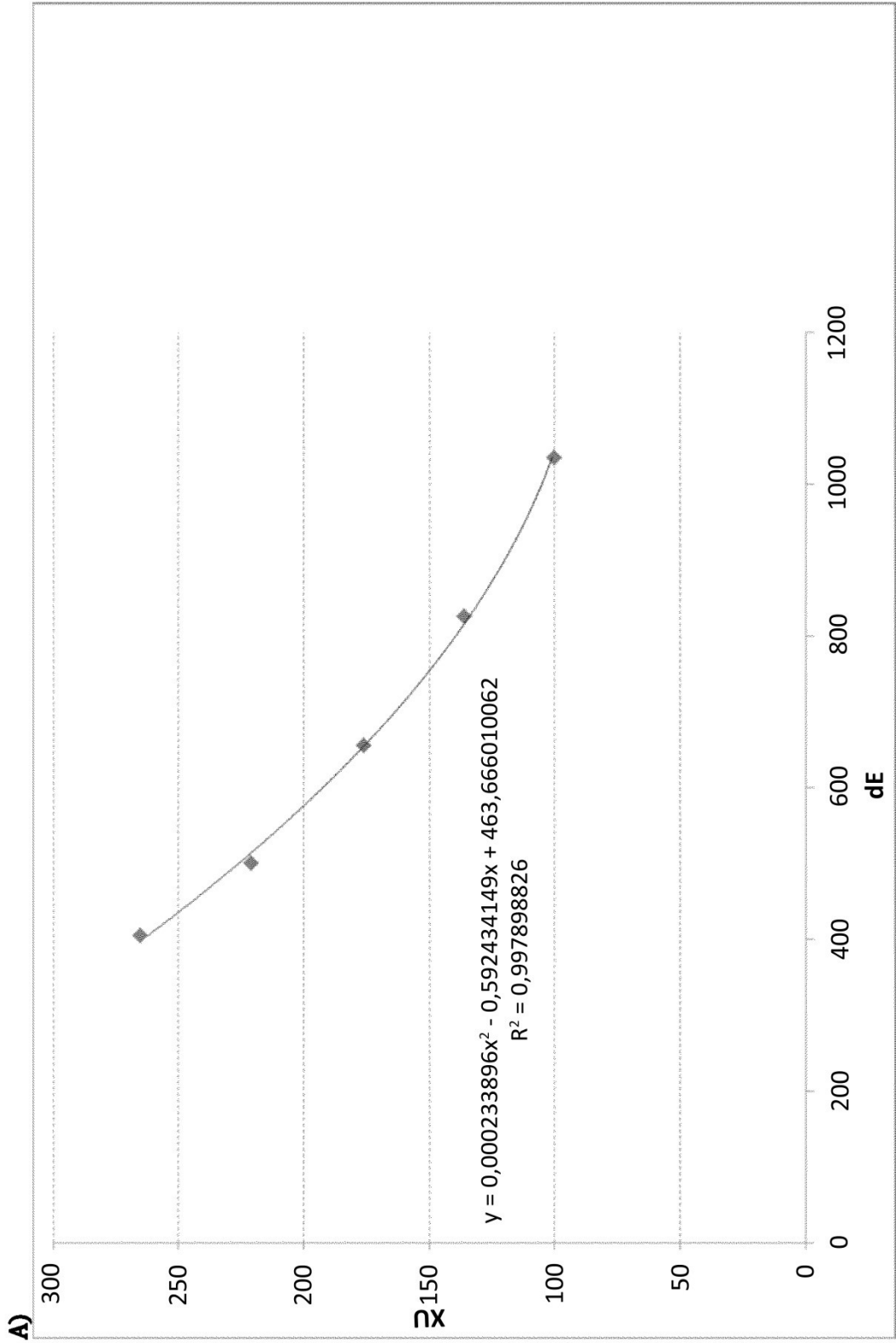


Fig. 5

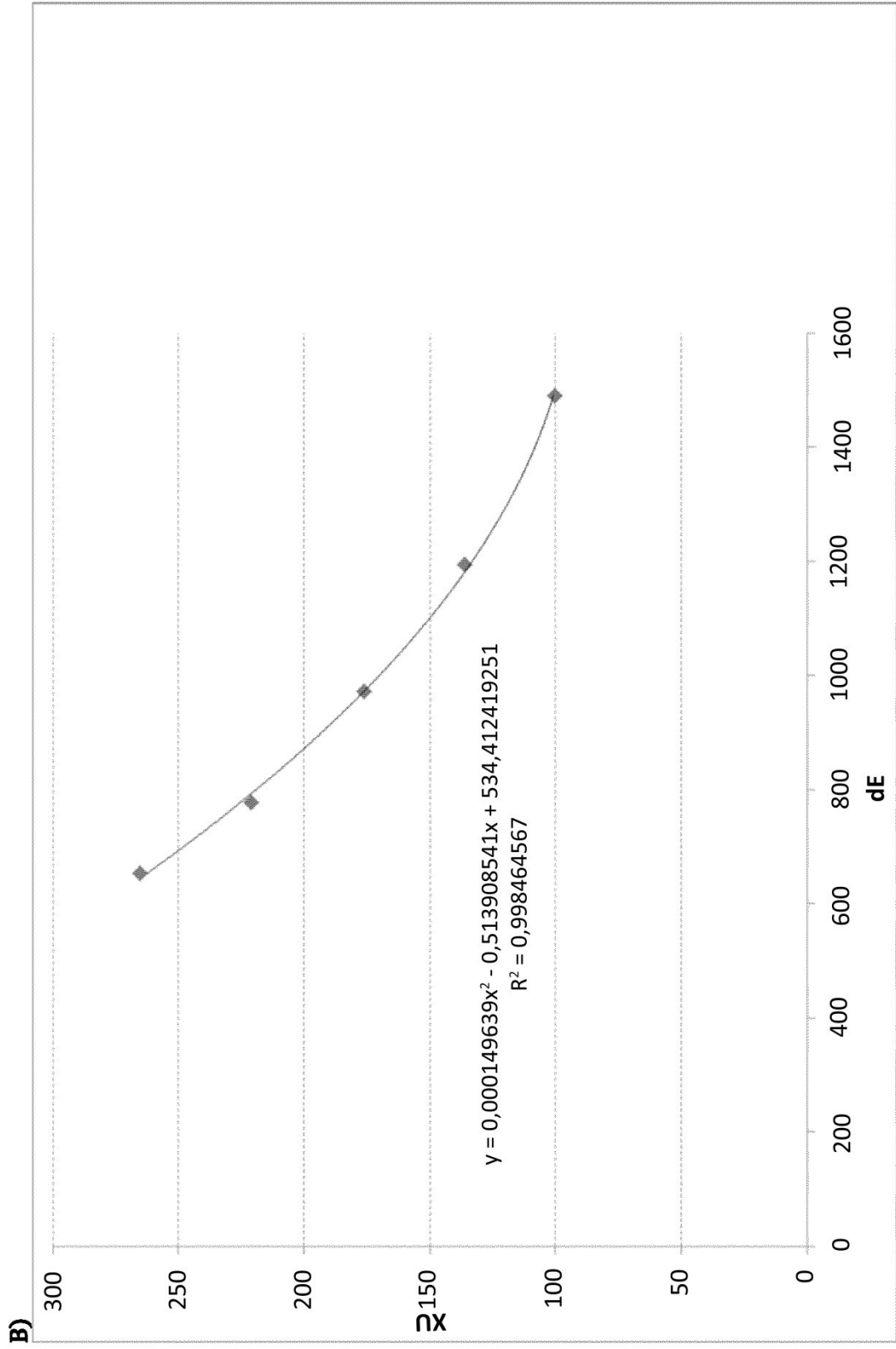


Fig. 5

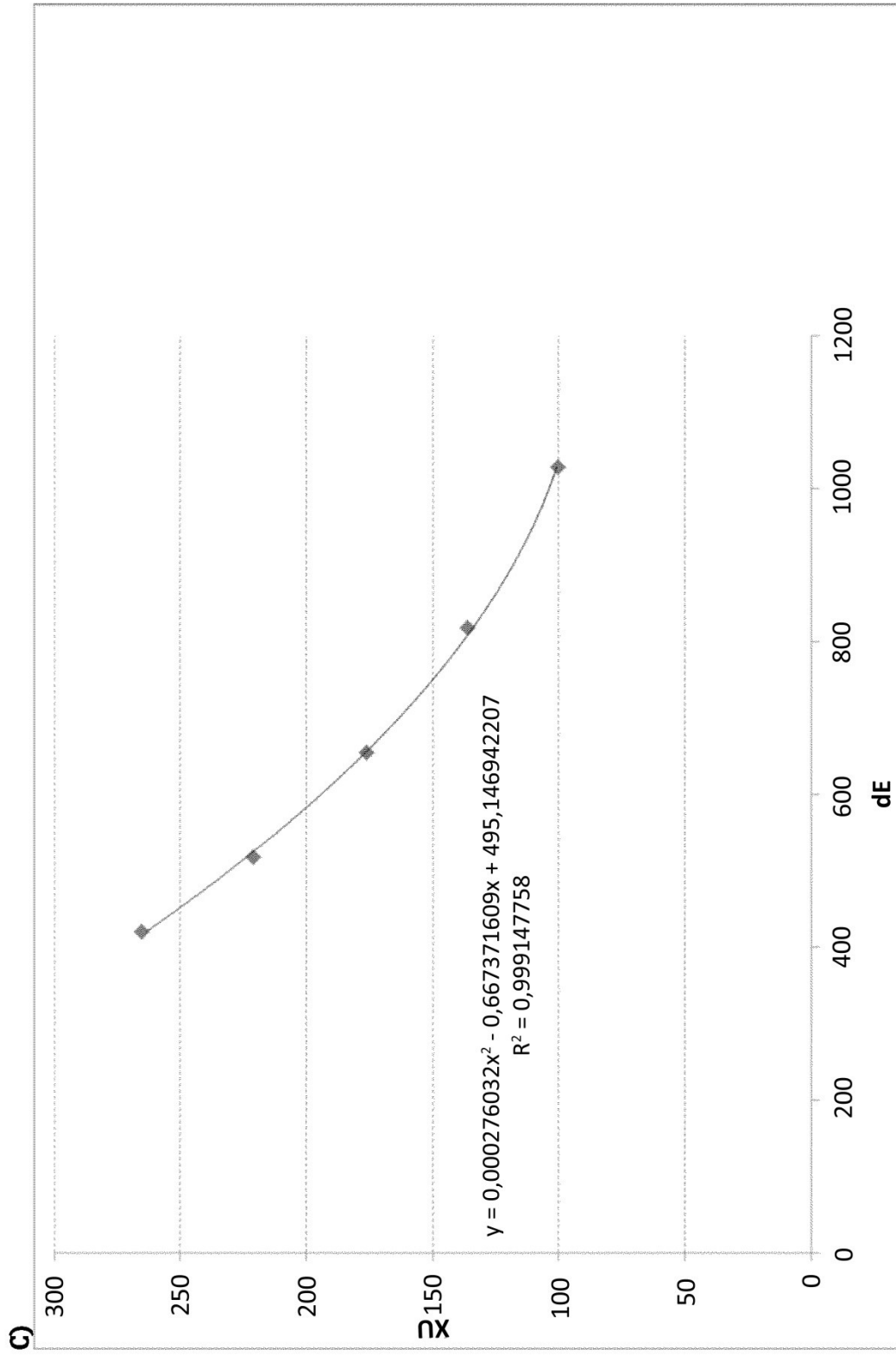


Fig. 5

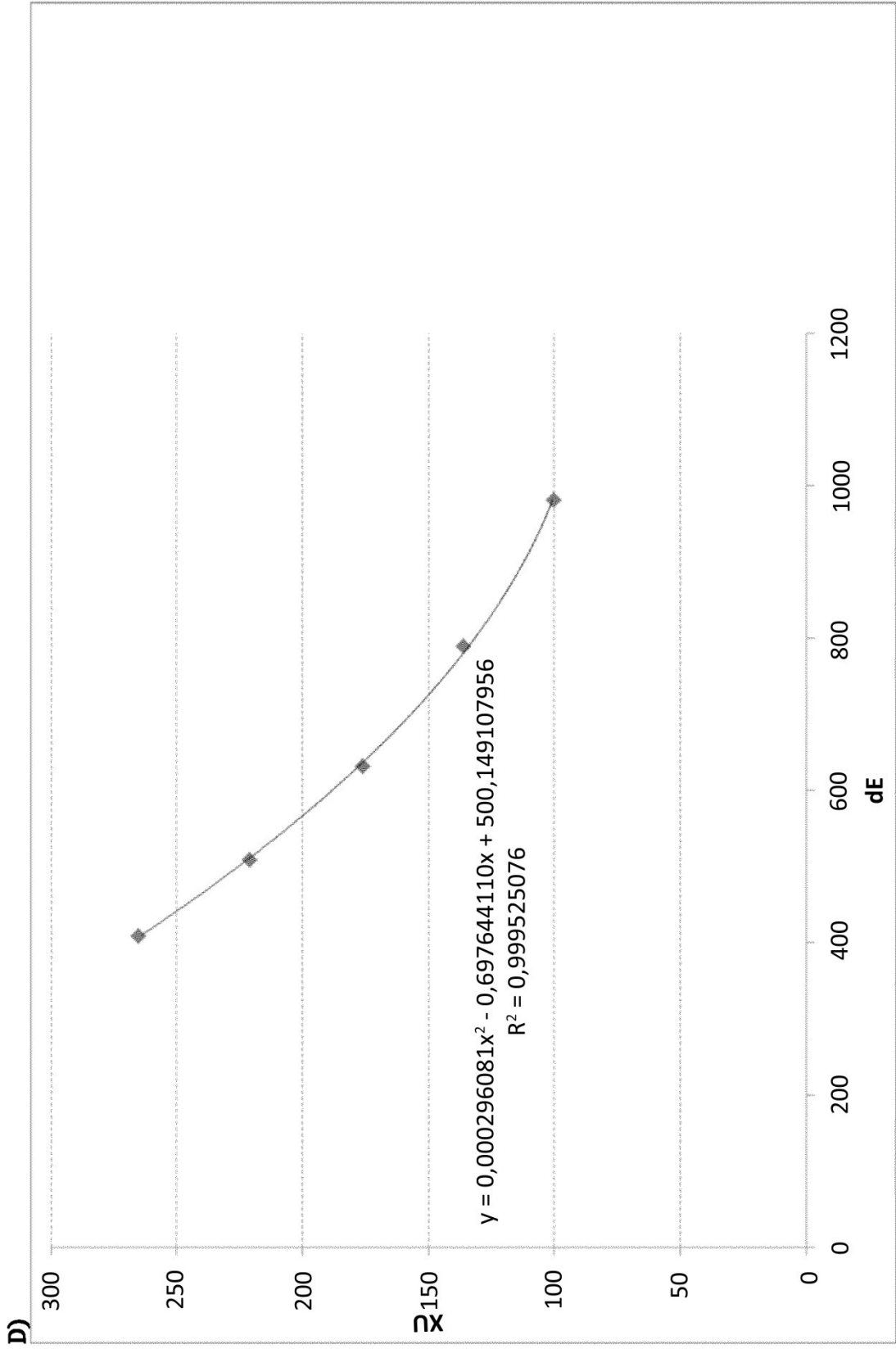


Fig. 6

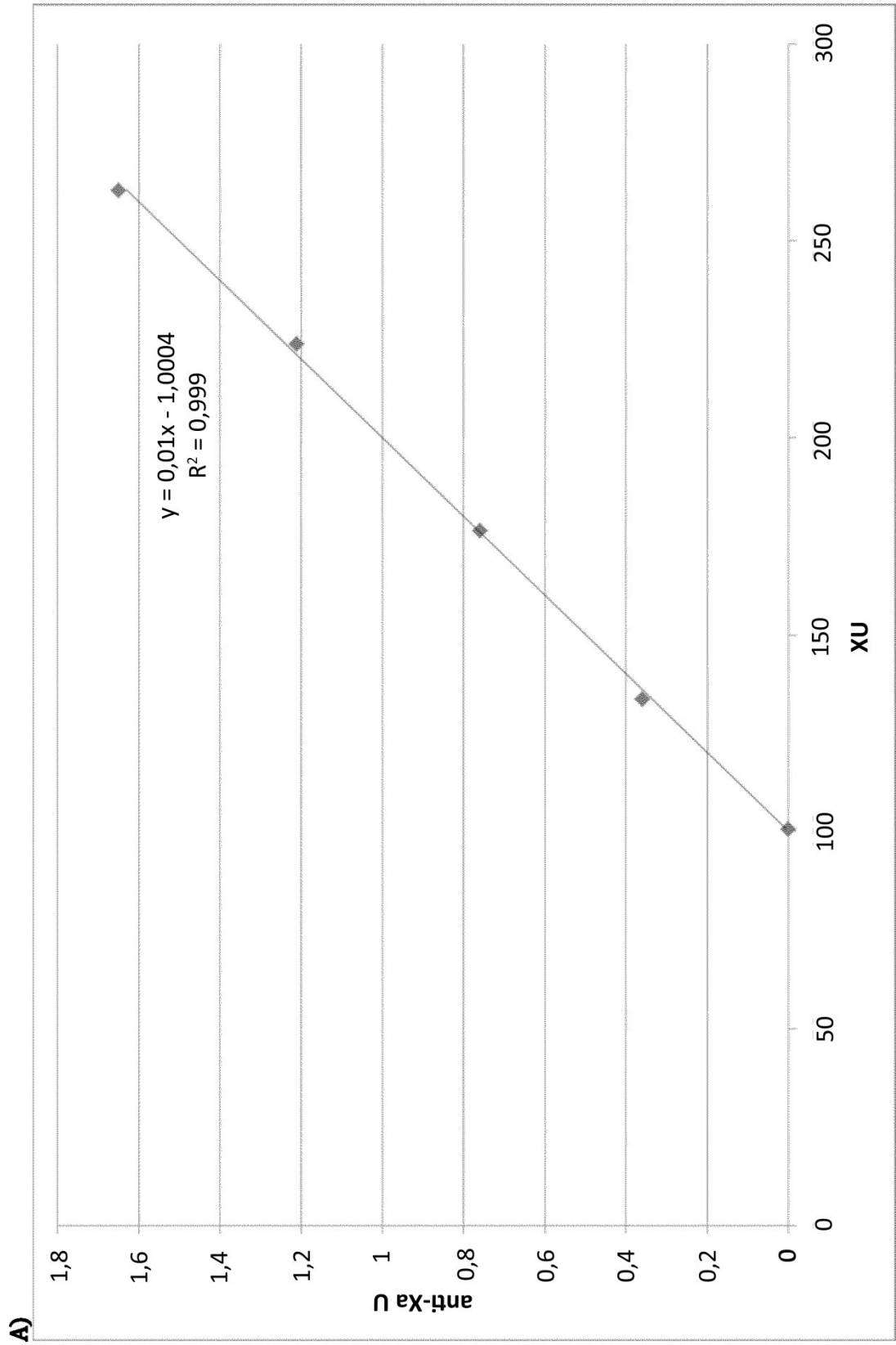


Fig. 6

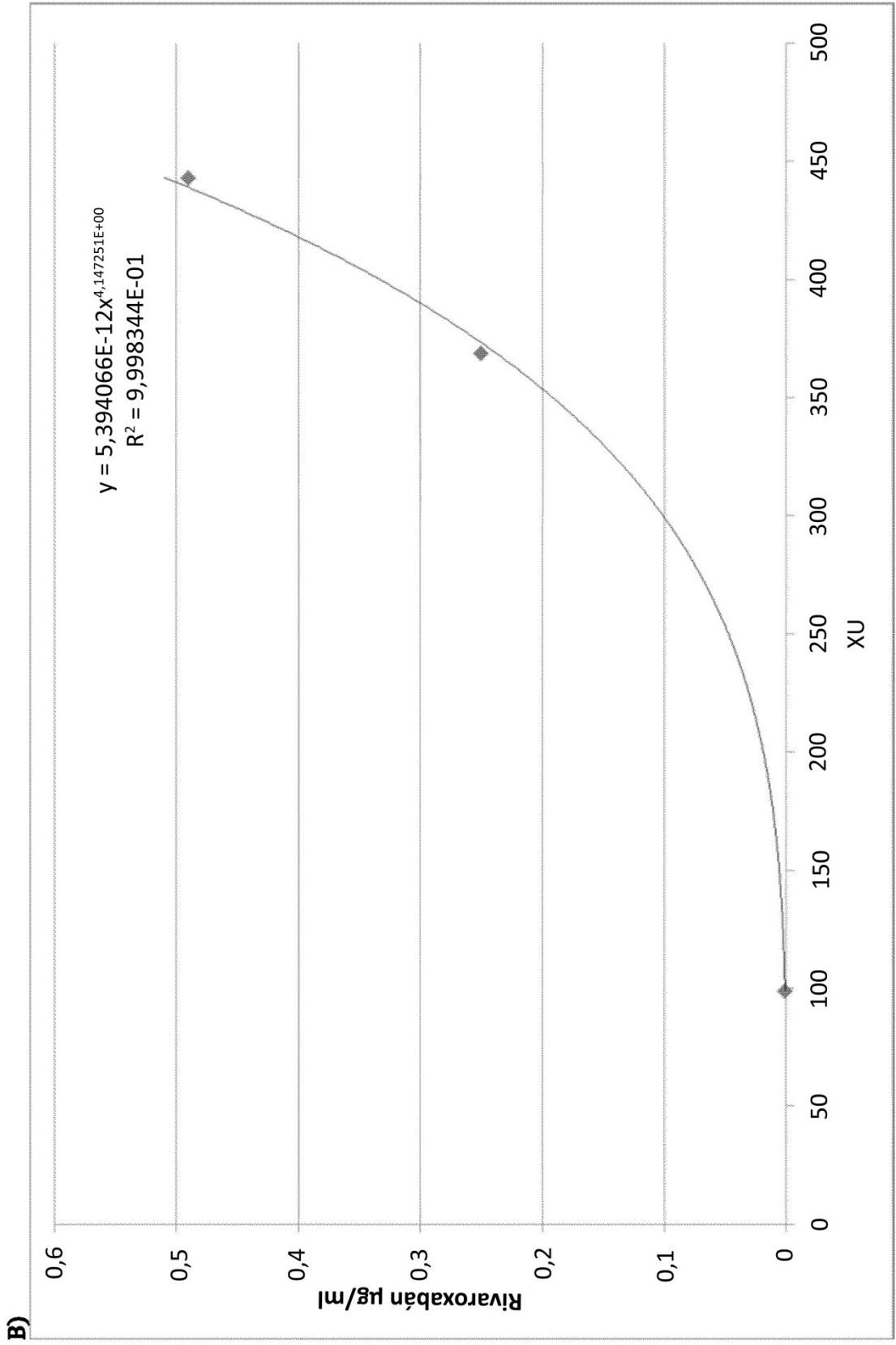


Fig. 6

