



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 239 388**

⑤① Int. Cl.7: **G01N 33/86**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98914766 .5**

⑧⑥ Fecha de presentación : **24.04.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0977995**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2000**

⑤④ Título: **Procedimiento para la detección funcional de trastornos en el sistema de la proteína C.**

③⑩ Prioridad: **25.04.1997 CH 97497**  
**03.09.1997 CH 2062/97**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2005**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2005**

⑦③ Titular/es: **Pentapharm AG.**  
**Engelgasse, 109**  
**4002 Basel, CH**

⑦② Inventor/es: **Stocker, Kurt;**  
**Gempeler-Messina, Patrizia y**  
**Müller, Christian**

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 239 388 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección funcional de trastornos en el sistema de la proteína C.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección sensible y funcional de trastornos en el sistema de la proteína C (proteína C, proteína S, FV), y en particular para la determinación del factor V de coagulación en la sangre activado (FVa) con estabilidad aumentada con respecto a la descomposición mediante proteína C activada (APC).

10 La hemostasia tras lesiones vasculares resulta de una interacción entre las células sanguíneas de los tejidos (plaquetas de la sangre) y las proteínas de la sangre (factores de coagulación plasmáticos, iones de calcio). Esta interacción conduce primero a la formación de un trombo hemostático (hemostasia primaria) y finalmente a su solidificación mediante coagulación, es decir, mediante la formación de una red de fibrina insoluble. El contenido fisiológico de calcio en la sangre, de 60-70 mg por litro, es esencial para la evolución óptima de las reacciones de coagulación de la sangre. El sistema fibrinolítico es responsable de la descomposición enzimática de los coágulos de fibrina durante la cicatrización de heridas y la recanalización de vasos cerrados. Estos sistemas de interferencia están modulados por activadores e inhibidores, y están presentes en el organismo sano en un equilibrio lábil. Las perturbaciones de este equilibrio pueden conducir, por un lado, a un aumento de la tendencia a hemorragias, y, por otro lado, a la propensión a la trombosis. Los trastornos hemostáticos provocan o acompañan muchas enfermedades y terapias, en cuyos casos el balance se puede perturbar a favor de la hemorragia o de la trombosis.

La sección de la cascada de coagulación de la sangre, representada en la Figura 1, es de particular importancia para la presente invención. En H.R. Roberts, Overview of the Coagulation Reactions, en: K.A. High y H.R. Roberts (eds.) Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis, p. 35-50, Marcel Dekker: New York, Basel, Hong Kong (1995), se puede encontrar una exposición detallada sobre la cascada de reacción que conduce a la coagulación de la sangre.

Tras la lesión de la pared de los vasos, la sangre entra en contacto con las células del tejido que liberan sobre su superficie una glicoproteína de 50.000 Dalton que, como la denominada tromboplastina o factor tisular (TF), activa el sistema de coagulación de la sangre vía la ruta exógena. Las plaquetas de la sangre que se adhieren a estructuras tisulares liberan fosfolípidos que activan el sistema intrínseco de coagulación de la sangre. El TF forma con el factor (F) VII, presente en el plasma, un complejo que activa las proenzimas FX y FIX a las serina proteasas FXa y FIXa. Vía la ruta endógena, la FIXa, junto con su cofactor FVIIIa, también forma un activador eficaz para FX en presencia de iones de calcio y fosfolípidos. La FXa forma con FVa, con iones de calcio y con fosfolípidos un complejo (complejo de protrombinasa) que convierte la proenzima protrombina en trombina catalíticamente activa. La enzima trombina convierte al fibrinógeno, mediante proteólisis limitada, en monómero de fibrina que espontáneamente se polimeriza en fibrina.

Los factores Va y VIIIa son proteínas plasmáticas no enzimáticas que aceleran fuertemente la activación de FX y de protrombina, respectivamente, mediante FIX y FXa, respectivamente. En la Tabla 1 se muestra la eficacia catalítica del cofactor FVa sobre la activación de protrombina. Se puede observar que la activación de protrombina mediante FXa, fosfolípidos e iones de calcio se acelera alrededor de 250 veces sólo por la presencia de FVa.

La presencia de iones de calcio y de fosfolípidos es una condición esencial para la mayoría de las reacciones de la cascada de coagulación de la sangre. La eliminación de los iones de calcio mediante complejación, precipitación o intercambio iónico, inhibe totalmente la capacidad coagulante de la sangre. Esta propiedad se utiliza generalmente para obtener plasma sanguíneo con fines analíticos o terapéuticos mezclando sangre recientemente recogida con citrato de sodio para la complejación de iones de calcio, centrifugando y decantando de las células sedimentadas el líquido de la sangre sobrenadante, no coagulable. La capacidad coagulante del plasma con citrato se restaura añadiendo una cantidad fisiológica de una sal de calcio, mediante la denominada recalcificación.

TABLA 1

*Eficacia catalítica del complejo de protrombinasa*

Activación de la protrombina mediante el complejo de protrombina	
Xa	1
Xa, Ca <sup>2+</sup>	1,7
Xa, Ca <sup>2+</sup> , PL	8,3 x 10 <sup>3</sup>
Xa, Ca <sup>2+</sup> , PL, Va	2,0 x 10 <sup>6</sup>

El sistema anticoagulante de la proteína C evita una migración no controlada de los factores de coagulación de la sangre activados, desde el sitio de la lesión vascular y de la hemostasis. Al igual que en el sistema de coagulación

plasmática, un receptor unido a la célula, la trombomodulina (TM), y un cofactor no enzimático, la proteína S, así como los componentes secundarios fosfolípidos e iones de calcio participan en la activación del sistema de la proteína C. La trombina que escapa del sitio de la hemostasis se une a TM, pierde de ese modo sus propiedades coagulantes del fibrinógeno, y se convierte en el activador específico para la proenzima proteína C. La proteína C activada (APC) es una serina proteasa que, potenciada por la proteína S, separa e inactiva los factores de coagulación FVa y FVIIIa. Mediante la inactivación de estos cofactores, el proceso de coagulación se ralentiza enormemente: según la Tabla 1, tiene lugar un retraso de 250 veces sólo por la inactivación de FVa. Para una descripción tónica del sistema de la proteína C, véase K. Suzuki, Protein C: en: K.A. High y H.R. Roberts (eds.) Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis, p. 393-424, Marcel Dekker: New York, Basel, Hong Kong (1995).

La importancia biológica del sistema de la proteína C se ha puesto en evidencia en 1993 por B. Dahlbäck, quien observó que, en pacientes con tendencia a la trombosis, a diferencia de las personas sanas, el tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT, un control con función de diagnóstico para el sistema de coagulación endógeno) no se prolonga después de la adición de proteína C activada. Definió sus observaciones como “resistencia frente a la proteína C activada” (resistencia a APC). Esta resistencia es debida, en el 97% de los casos, a una mutación puntual en el gen del factor V. Este defecto heredado genéticamente se puede encontrar en alrededor del 5% de la población normal, y en al menos 20% de pacientes jóvenes con una primera tromboembolia inexplicable o con tromboembolias recurrentes. En presencia de la mutación, el factor V de coagulación activado ya no se puede separar, y de este modo se inactiva. Las consecuencias de la deficiencia de este componente anticoagulante particularmente importante del sistema de coagulación de la sangre pueden ser cardiopatías isquémicas, trombos venosos o tromboembolias. En consecuencia, los portadores heterocigóticos del defecto presentan un riesgo de trombosis 5-10 veces mayor que las personas normales, y los portadores homocigóticos del defecto presentan un riesgo incluso 50 hasta 100 veces mayor.

Otras deficiencias o defectos hereditarios o adquiridos en el sistema de la proteína C (deficiencia cualitativa o cuantitativa de la proteína C o de la proteína S) también están asociados con una mayor tendencia a la trombosis.

La resistencia congénita o adquirida a APC se puede detectar mediante un ensayo funcional o mediante la detección directa de la mutación a nivel del ADN (genotipo).

La detección funcional se puede realizar según Dahlbäck mediante una variante del APTT (documentos PCT/SE92/00310; WO 93710261) en la que la coagulación de una muestra de plasma libre de plaquetas es desencadenada una vez mediante cloruro de calcio sin adición de proteína C activada (APC), y una vez mediante cloruro de calcio con adición de APC. La cantidad de trombina que resulta en la mezcla de ensayo se determina mediante la conversión del fibrinógeno sustrato natural en un coágulo (tiempo de coagulación), o fotométricamente mediante la liberación de un cromóforo a partir de un sustrato cromogénico. La existencia de la mutación del factor V se puede observar por el hecho de que el tiempo de coagulación se prolonga solo débilmente sin APC, mientras que el APC prolonga enormemente el APTT del plasma normal. Dividiendo el tiempo de coagulación de la muestra con APC entre el tiempo de coagulación de la muestra sin APC se obtiene una relación de importancia para el diagnóstico. En personas sanas se encuentra una relación de más de 2,0; una relación entre 1,3 y 2,0 en portadores heterocigóticos del defecto; y una relación inferior a 1,3 en portadores homocigóticos del defecto. Sin embargo, puesto que este sistema de ensayo se basa en la activación de la coagulación en presencia de iones de calcio, las anormalidades cuantitativas y cualitativas en los factores de coagulación plasmáticos dependientes de calcio (FII, VII, VIII, IX, X) pueden falsificar el resultado. La deficiencia o disfunción de la proteína S puede dar valores erróneamente positivos, y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (anticoagulantes del *lupus*) pueden dar valores erróneamente negativos. La presencia de plaquetas en una muestra plasmática preparada sin cuidado puede influir en el resultado, y, finalmente, una terapia con anticoagulantes orales o con heparina puede influir en el resultado del ensayo de una muestra de plasma.

Tras el trabajo de Dahlbäck, los investigadores se centraron en las mejoras o modificaciones del sistema de ensayo original. Así, para una determinación funcional más específica de la resistencia a APC, por ejemplo, se recomienda mezclar la muestra a ensayar con plasma deficiente en FV, en la relación 20:80, antes de la utilización en el procedimiento de ensayo (Behringwerke EP 0711838 A1). El plasma utilizado, deficiente en FV, debe contener una concentración normal de factor VIII, puesto que concentraciones de FVIII demasiado altas o demasiado bajas, en la muestra del paciente, falsificarían los resultados. Este procedimiento permite reducir perturbaciones debido a anormalidades en factores de coagulación plasmáticos dependientes de calcio (Witt I., Kraus M. APC-Resistenz: Klinik, Pathophysiologie und Diagnostik. Hämostaseologie, 1996; 16:60-67).

La influencia perturbadora de la heparina se puede reducir por adición de un antagonista de la heparina, por ejemplo bromuro de hexadimetrina (polibreno), con lo que el falso tiempo de coagulación sólo se corrige, sin embargo, en presencia de APC. El APTT sin adición de APC permanece prolongado, de forma que, en este caso, la relación de APC no se puede utilizar para una evaluación. Además, la presencia de anticoagulantes del *lupus*, que también provoca una prolongación del APTT, ya no es evidente. En este caso, se requiere de este modo un ensayo adicional de coagulantes del *lupus*. El cálculo de la relación de APC no se puede llevar a cabo en el caso de un APTT anormal que supere el 50%.

Exner (documentos PCT/AU95/00474; WO 96/04560) describe modificaciones de la patente de Dahlbäck. Aquí, los factores V y X endógenos se activan mediante la utilización de venenos de serpiente, con lo que se debería alcanzar un aumento de la sensibilidad. Puesto que este principio de ensayo también requiere la presencia de iones de calcio, no es posible con esta variante de ensayo identificar todos los plasmas resistentes a APC ni distinguirlos de los normales.

## ES 2 239 388 T3

Por las razones mencionadas anteriormente, los ensayos funcionales de la técnica anterior disponibles, que trabajan en el medio de reacción recalcificado, no permiten todavía diagnosticar una resistencia a APC con una certeza del 100%. Existen siempre muestras plasmáticas dudosas, es decir, a menudo es imposible la diferenciación entre plasmas normales y plasmas procedentes de pacientes con mutación de FV hereditaria o adquirida heterocigóticamente, ni la diferenciación entre portadores de la mutación heterocigóticos y homocigóticos. En consecuencia, una determinación definida sólo es posible con el análisis genómico complejo, que consume tiempo y costoso mediante PCR (reacción en cadena de polimerasa).

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la dependencia de FV de activadores de protrombina procedentes de venenos de serpiente definidos, que se describen en la bibliografía como dependientes de calcio, de fosfolípidos y de FV, es mayor en ausencia que en presencia de iones de calcio. Además, se ha encontrado que el efecto estimulante de cofactor de factor Va es particularmente obvio cuando, en lugar de iones de calcio, se añade incluso un agente complejante de calcio, por ejemplo el agente quelatante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), a la mezcla de ensayo (Ejemplo 1). Se ha encontrado finalmente que el citado activador de veneno de serpiente es extraordinariamente apropiado para la detección específica y de diagnóstico de resistencia adquirida o hereditaria a APC en ausencia de iones de calcio en la mezcla de ensayo.

El procedimiento comprende básicamente incubar una muestra de plasma con un activador de proteína C y/o con APC, desencadenar la coagulación añadiendo un activador de protrombina independiente de calcio pero dependiente de FV, sin embargo sin adición de iones de calcio, medir el tiempo de coagulación y comparar este último con el tiempo de coagulación de un plasma de referencia. El tiempo de coagulación se prolonga en un plasma normal, pero no en un plasma con resistencia a APC, de forma que la comparación del tiempo de coagulación de la muestra de plasma con el tiempo de coagulación del plasma de referencia permite fácilmente concluir la presencia o ausencia de una resistencia a APC.

El plasma de referencia sin resistencia a APC puede estar compuesto de muchos plasmas normales, una mezcla de plasma normal y/o heterocigótico y/u homocigótico, o un único plasma (= plasma normal). La comparación de los tiempos de coagulación de la muestra de plasma con los del plasma de referencia se puede realizar con, así como también sin, adición de un activador de proteína C o adición de APC, respectivamente, al plasma de referencia.

Además, parte de la muestra de plasma a investigar se puede utilizar como el plasma de referencia.

Los dispositivos para medir el tiempo de coagulación se pueden ajustar con un plasma de referencia de tal manera que el tiempo de coagulación del plasma de referencia ascienda hasta, por ejemplo, 80-140 segundos. De ese modo, la relación entre el factor V mutado y normal, en el plasma de referencia, puede estar comprendida, por ejemplo, entre 20:80 y 80:20.

El ajuste de los dispositivos con plasmas de referencia se puede realizar, por ejemplo, una vez al mes, o en paralelo con las mediciones de las muestras de plasma.

Sin embargo, no es necesario ajustar los dispositivos para la medición del tiempo de coagulación. Generalmente es suficiente medir el tiempo de coagulación de una muestra de plasma y compararlo con los valores pragmáticos de los plasmas de referencia, añadidos por ejemplo a los kits de ensayo según tablas. A partir de los valores comparados, finalmente se pueden hacer conclusiones sobre el plasma de la sangre homocigótico, heterocigótico o normal, lo que representa - comparado con las mediciones requeridas de la técnica anterior - una simplificación considerable.

En caso de que la muestra de plasma a investigar se use simultáneamente como el plasma de referencia, es posible a) incubar parte de una muestra de plasma con un activador de proteína C y/o con APC, desencadenar la coagulación mediante adición de un activador de protrombina independiente de calcio, sin adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al sistema de ensayo, b) desencadenar la coagulación en otra parte de la muestra de plasma sin adición de un activador de proteína C ni de APC, mediante adición de un activador de protrombina independiente de calcio, sin adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al sistema de ensayo, y c) medir el tiempo de coagulación y demostrar la perturbación en el sistema de la proteína C, a partir de la comparación de ambos tiempos de coagulación, o a partir del valor del cociente de ambos tiempos de coagulación procedentes de las partes de la muestra respectiva según se ha mencionado previamente en a) y b).

La sensibilidad del procedimiento aumenta considerablemente mediante la adición de un agente complejante de calcio, y su especificidad por FV mutado se puede aumentar mediante dilución de la muestra de plasma con plasma libre de FV.

En la realización de un ensayo con adición de APC y de un ensayo sin adición de APC, y el cálculo de una relación, no es necesario si el procedimiento de la presente invención se realiza en condiciones estándares con relación a reactivos, aditivos y dispositivos. En este caso, el tiempo de coagulación o la división del sustrato, respectivamente, permite determinar directamente la cantidad de FV en la muestra de plasma.

La ventaja de este procedimiento reside en el hecho de que las acciones competitivas o perturbadoras, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que conducen a la activación de la protrombina, a un aumento o reducción de la concentración del factor VIII, a anticuerpos inhibidores específicos contra componentes definidos del plasma, por ejemplo anticoagulante del

## ES 2 239 388 T3

*lupus*, a la presencia de plaquetas, a plasmas procedentes de pacientes que toman anticoagulantes orales y pacientes heparinizados, están reprimidas por la ausencia de iones de calcio.

Además, una ventaja particular del procedimiento de la presente invención reside en la detección específica y funcional de modificaciones estructurales de FV, y en particular de la mutación FV:Q<sup>506</sup> frecuente (FV Leiden). Esta parte se puede obtener en el caso normal mediante determinación del tiempo de coagulación del plasma en presencia de APC (ejemplos 3 y 5) así como en presencia de un activador adecuado de la proteína C (ejemplos 2 y 4) durante la activación de la protrombina en ausencia de iones de calcio y posiblemente en presencia de agentes quelatantes, tales como EDTA, y mediante la comparación de este tiempo de coagulación del plasma con el de un plasma de referencia. Como activador apropiado de la proteína C, se puede utilizar, por ejemplo, Protac<sup>®</sup>, un producto comercialmente disponible de la firma Pentapharm Ltd. (Kurt F. Stocker y Lars G. Svendsen, documento EP 0 203 509 B1). La especificidad de ambos procedimientos (APC y activador de la proteína C, respectivamente) es tan elevada que se pueden distinguir los portadores homocigóticos del factor V resistente a APC, los portadores heterocigóticos de FV resistentes a APC, y las poblaciones normales, con muy buena aproximación. Además, los valores obtenidos también permiten determinar si los portadores heterocigóticos contienen más o menos FV resistente a APC.

El procedimiento de la presente invención se puede adaptar fácilmente a diferentes técnicas de análisis de coagulación de la sangre. De este modo, también se pueden utilizar sustratos cromogénicos, fluorogénicos o amperogénicos, u otros procedimientos de determinación del estado de la técnica, para determinar los valores a definir. En consecuencia, la composición de la mezcla de ensayo se puede adaptar a los requisitos metodológicos y técnicos modificando la naturaleza o cantidad de agentes quelatantes, ajustando específicamente el valor de pH o añadiendo inhibidores definidos del sistema de coagulación (incluyendo el sistema PC).

Además del Protac<sup>®</sup> comercial, como activadores de la proteína C se pueden utilizar básicamente activadores de la proteína C o fracciones posiblemente purificadas procedentes de venenos de la serpiente *Agkistrodon contortrix* y sus subespecies, *Agkistrodon piscivorus* y sus subespecies, *Agkistrodon bilineatus* y sus subespecies o *Agkistrodon halys* y sus subespecies.

Puesto que este procedimiento permite determinar básicamente no sólo el factor V sino también los defectos de la proteína C o de la proteína S, puede ser ventajoso añadir plasmas deficientes correspondientes, por ejemplo plasma deficiente en FV, en proteína C o en proteína S. El procedimiento de ensayo no reacciona sensiblemente a las cantidades presentes de plasma deficiente, permitiendo la adición de pequeñas cantidades de, por ejemplo, 1%, hasta grandes cantidades de, por ejemplo, 99%, de plasma deficiente, sin modificar considerablemente los valores determinados.

Ventajosamente se utilizan cantidades  $\geq 50\%$  de plasmas deficientes.

La adición de fosfolípidos no es necesaria para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Sin embargo, puesto que el plasma contiene diversas trazas de fosfolípidos - dependiendo del modo de su preparación -, una adición de fosfolípido podría limitar el intervalo de variación de los resultados del ensayo.

Como activadores de la protrombina independientes de calcio, se pueden utilizar en la presente invención enzimas de venenos de serpiente dependientes de FV, en forma de venenos brutos así como fracciones de venenos purificadas. Los activadores de protrombina son independientes del calcio si son capaces de ejercer completamente su función según la presente invención también sin adición de calcio. Para su utilización práctica, las preparaciones de activador de protrombina se pueden proporcionar con aditivos estabilizantes conocidos *per se*. Los venenos de serpiente apropiados, o fracciones de venenos de serpiente purificadas, para la preparación de preparaciones del activador de la protrombina de la presente invención, son venenos con un efecto dominante activador de la protrombina dependiente de FV, que también se desarrolla sin adición de calcio. Los venenos de serpiente utilizados preferentemente en la presente invención proceden de la especie *Elapidae Notechis*, *Tropidechis*, *Cryptophys*, *Hoplocephalus* y *Pseudechis*, tales como *Notechis scutatus scutatus*, *Notechis ater niger*, *Notechis ater humphreysi*, *Notechis ater serventyi*, *Notechis flindersi*, *Notechis occidentalis*, *Tropidechis carinatus*, *Cryptophys nigrescens*, *Hoplocephalus stephensii* y *Pseudechis prophyriacus* (Ejemplo 6). Además de los activadores de la protrombina procedentes del veneno de serpiente, básicamente también se pueden utilizar activadores producidos a partir de microorganismos con un genoma natural o recombinante.

El agente quelatante preferido en la presente invención, debido a su amplia distribución, es EDTA, pero el examen de diferentes agentes quelatantes de Ca<sup>2+</sup> y de agentes precipitantes del calcio ha demostrado que también se pueden aplicar otras sustancias estructuralmente diferentes del EDTA, tales como citrato u oxalato (Ejemplo 7). Entre otros agentes quelatantes, también se pueden citar EGTA (ácido etileno-bis-(oxietileno-nitrilo)-tetraacético), desferroxamina, tetraciclina, BAPTA (ácido 1,2-bis-(2-aminofenoxi)-etano-N,N',N',N'-tetraacético) y sus sales, y la sal de tetrapotasio del ácido quin-2-(2-[(2-amino-5-metilfenoxi)-metil]-6-metoxi-8-aminoquinolin-N,N',N'-tetraacético). También se pueden aplicar otros procedimientos para eliminar el exceso de calcio, por ejemplo precipitaciones con sulfato o con carbonato, adsorción o procedimientos que ejercen el efecto del EDTA sobre los activadores de la protrombina dependientes de FV.

Para la detección de la activación de la protrombina sensible a APC, dependiente de FV, la determinación del tiempo de coagulación del plasma se puede llevar a cabo manual o automáticamente, mecánicamente, electromag-

néticamente o fotométricamente. En una mezcla de ensayo de la presente invención, la trombina generada también se puede determinar fotométrica, fluorométrica o amperométricamente utilizando sustratos sintéticos apropiados, cromogénicos, fluorogénicos o amperogénicos, respectivamente (Ejemplo 8). Para un repaso de sustratos sintéticos en hemostaseología, véase Witt I., Test Systems with synthetic peptide substrates in haemostaseology, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1991, 29:355-374. Un sustrato cromogénico adecuado es, por ejemplo, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA-AcOH (Pefachrom TH) comercialmente disponible de la firma Pentapharm Ltd.

Según la presente invención, las influencias perturbadoras debidas a plasmas heparinizados se pueden evitar con un antagonista de heparina, tal como polibreno, sales de protamina o enzimas que dividen a la heparina. Con pero también sin antagonistas de la heparina, es posible - contrario a la técnica anterior - distinguir claramente entre plasmas con defecto de FV homocigóticos, plasmas con defecto de FV heterocigóticos, y plasmas normales (Ejemplo 9).

La fase de incubación en el procedimiento de la presente invención se puede acortar considerablemente añadiendo un activador del factor V a la mezcla de ensayo. Como activador del factor V, se pueden utilizar, por ejemplo, RVV-V de *Vipera russelli*, o activadores del factor V procedentes de venenos de las serpientes *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Naja n. oxiana*, *Echis carinatus*, *Echis multisquamatus*, *Vipera ursini*, *Vipera lebetina*, *Haemachatus haemachatus*, *Naja m. Mossambica*, *Naja nivea*, *Naja nigricollis*, *Naja h. haje*, *Naja n. kaouthia*, *Naja melanoleuca*, *Pseudechis australis*, *Pseudonaja t. textilis*, *Notechis ater*, *Oxyuranus scutellatus*, o de la oruga *Lonomia achelous*.

La determinación de la resistencia a APC después de recoger, preparar y estabilizar la muestra según las condiciones, se realiza preferentemente en dos etapas que casi no se pueden dividir en la práctica. Las dos etapas se pueden denominar como fase de incubación y como fase de activación de la protrombina. Las muestras adecuadas para esto son, por ejemplo, muestras de plasma estabilizadas con citrato. Sin embargo, también se pueden utilizar estabilizantes tales como oxalato o EDTA. La activación de FV de la muestra, que se puede alcanzar mediante procedimientos conocidos *per se*, por ejemplo, con RVV-V (de *Vipera russelli*), se produce durante la fase de incubación, preferentemente en presencia de plasma deficiente en FV. Esta reacción de activación con o sin APC o un activador de la proteína C pertenece a la fase de incubación, siendo añadidos los agentes requeridos preferentemente al comienzo de la fase de incubación. La fase de activación de la protrombina comienza con la adición del veneno de serpiente dependiente de FV, o la fracción purificada correspondiente de veneno de serpiente, respectivamente. La adición de un agente quelatante (por ejemplo, EDTA) a la muestra puede aumentar la especificidad. Tal agente quelatante se añade típicamente, pero no de forma absolutamente necesaria, con la enzima de veneno de serpiente dependiente de FV.

Se debe señalar que el procedimiento de la presente invención no excluye variaciones con adición solapada, por etapas, o incluso continua, de componentes individuales o de varios de los citados componentes. La duración de la fase de incubación depende, entre otros, del problema y de la naturaleza de la activación utilizada del sistema de APC. Típicamente oscila de 1 a 40 minutos, preferentemente por debajo de 30 minutos.

Los kits de la presente invención que se pueden utilizar para la detección de defectos en el sistema de la proteína C contienen APC o activadores de la proteína C, tales como Protac<sup>®</sup>, un activador de la protrombina y posiblemente un activador del factor V, tal como RW-V. Además, a estos kits se les pueden añadir fosfolípidos, plasma deficiente en factor V, un agente complejante de Ca, tal como EDTA, y - dependiendo del procedimiento de detección aplicado - uno o varios plasmas de referencia, y un antagonista de la heparina.

A continuación, la invención se explica con más detalle mediante los ejemplos. Se utilizan las siguientes abreviaturas:

APC: proteína C activada  
 RW-V: activador de FV procedente de *Vipera russelli*  
 Protac<sup>®</sup>: activador de proteína C procedente de *Agkistrodon contortrix contortrix*

La manera de estabilizar las muestras de plasma utilizadas de las personas de ensayo no tiene importancia puesto que se obtienen resultados representativos no sólo con las muestras estabilizadas mediante citrato. Las muestras de plasma se examinaron todas con respecto a la resistencia a APC mediante detección directa de mutación a nivel de ADN.

#### Ejemplo 1

##### 60 Dependencia del FV del activador de la protrombina procedente de veneno de *Notechis scutatus scutatus*

El tiempo de coagulación se determinó mediante un coagulómetro KC4 (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40  $\mu$ l de plasma deficiente en FV, 10  $\mu$ l de muestra de plasma (+ FV) o 50  $\mu$ l de plasma deficiente en FV (- FV), durante 1 minuto a 37°C con 50  $\mu$ l de Hepes 50 mM, pH 7,5. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50  $\mu$ l de activador de la protrombina 5  $\mu$ g/ml, procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 25 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ g/ml de activador de la protrombina sin aditivos, o en 10-40 mM de EDTA (Tabla 2). Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación se determina en presencia y en ausencia de FV. Se obtiene una relación a partir del tiempo de coagulación con FV y sin FV.

## ES 2 239 388 T3

Los resultados obtenidos muestran cómo la adición de iones de calcio altera la dependencia de FV del sistema de ensayo. La dependencia de FV del sistema de ensayo se podría intensificar considerablemente sin adición de iones de calcio, o con adición de EDTA.

5

TABLA 2

10

Aditivos	Activador de la protrombina $\mu\text{g/ml}$	Tiempo de coagulación		Relación + FV / - FV
		+ FV	- FV	
25 mM de $\text{CaCl}_2$	0,5	51,6	106,0	2,05
Sin aditivos	5	46,3	141,3	3,05
10 mM de EDTA	5	39,2	196,3	5,00
15 20 mM de EDTA	5	48,0	262,6	5,48
30 mM de EDTA	5	59,3	334,5	5,64
40 mM de EDTA	5	72,0	472,3	6,56

20 Ejemplo 2

*Determinación de la resistencia a APC utilizando Protac®*

25

El tiempo de coagulación se determinó con un coagulómetro KC4 micro (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40  $\mu\text{l}$  de plasma deficiente en FV, 10  $\mu\text{l}$  de muestra de plasma y 50  $\mu\text{l}$  de 2 U/ml de Protac®, 1 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 20 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50  $\mu\text{l}$  de activador de la protrombina 5  $\mu\text{g/ml}$ , procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 15 mM de EDTA. Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación de una muestra de plasma se comparó con el tiempo de coagulación de una muestra de plasma procedente de un conjunto de plasmas libres de resistencia a APC, o con plasmas normales libres de resistencia a APC, respectivamente. Se obtuvo un cociente entre los dos tiempos de coagulación, con Protac® de la muestra de plasma y el del conjunto de plasmas.

30

35

Los resultados obtenidos muestran que el cociente del conjunto de plasmas con respecto a los plasmas con defecto de FV heterocigótico a plasmas con defecto de FV homocigótico disminuye en un grado tal que no sólo es posible una distinción entre plasmas normales y aquellos con defectos de FV, sino también entre defectos de FV heterocigóticos y homocigóticos en los plasmas.

TABLA 3

40

Muestra de plasma	Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación de muestra de plasma/Tiempo de coagulación de conjunto de plasmas
1. Conjunto de plasmas sin resistencia a APC	97,4	1,00
2. Defecto de FV homocigótico	44,7	0,46
3. Defecto de FV heterocigótico	59,9	0,62
4. Defecto de FV heterocigótico	66,0	0,68
50 5. Defecto de FV heterocigótico	61,4	0,63
6. Defecto de FV heterocigótico	60,3	0,62
7. Defecto de FV heterocigótico	67,2	0,69
8. Defecto de FV heterocigótico	61,9	0,64
55 9. Defecto de FV heterocigótico	69,7	0,72
10. Normal	96,5	0,99
11. Normal	82,3	0,85
12. Normal	101,4	1,04
60 13. Normal	93,6	0,96
14. Normal	103,1	1,06
15. Normal	111,1	1,14
16. Normal	97,6	1,00
65 17. Normal	94,7	0,97
18. Normal	95,3	0,98
19. Normal	98,3	1,01

## ES 2 239 388 T3

### Ejemplo 3

#### *Determinación de la resistencia a APC utilizando APC*

5 El tiempo de coagulación se determinó con un coagulómetro KC4 micro (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40  $\mu\text{l}$  de plasma deficiente en FV, 10  $\mu\text{l}$  de muestra de plasma y 50  $\mu\text{l}$  de 10 U/ml de APC, 10 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 8 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50  $\mu\text{l}$  de activador de la protrombina 5  $\mu\text{g/ml}$ , procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 15 mM de EDTA. Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación de una muestra de plasma se comparó con el tiempo de coagulación de una muestra de plasma procedente de un conjunto de plasmas libres de resistencia a APC. Se obtuvo un cociente entre el tiempo de coagulación de la muestra de plasma con APC y el tiempo de coagulación de los plasmas en el conjunto de plasmas (Tabla 4).

15 Los resultados obtenidos muestran que la adición exógena de APC prolonga el tiempo de coagulación del conjunto de plasmas o el de los plasmas normales, respectivamente, mientras que el tiempo de coagulación de los plasmas con defecto de FV heterocigótico, y, en particular, con defecto de FV homocigótico, se acorta significativamente en un grado tal que no sólo es posible distinguir plasmas sanos de aquellos con un defecto de FV, sino también defectos de FV heterocigóticos de los homocigóticos.

TABLA 4

Muestra de plasma	Tiempo de coagulación + APC [s]	Tiempo de coagulación de muestra de plasma/Tiempo de coagulación de conjunto de plasmas
1. Conjunto de plasmas sin resistencia a APC	90,0	1,00
2. Defecto de FV homocigótico	54,8	0,60
3. Defecto de FV heterocigótico	59,9	0,67
4. Defecto de FV heterocigótico	66,0	0,73
5. Defecto de FV heterocigótico	61,4	0,68
6. Defecto de FV heterocigótico	58,9	0,65
7. Defecto de FV heterocigótico	60,3	0,67
8. Defecto de FV heterocigótico	60,9	0,68
9. Defecto de FV heterocigótico	67,3	0,75
10. Normal	96,5	1,07
11. Normal	77,5	0,86
12. Normal	79,8	0,88
13. Normal	82,3	0,91
14. Normal	101,4	1,13
15. Normal	76,6	0,85
16. Normal	93,6	1,04
17. Normal	103,1	1,15
18. Normal	79,6	0,88
19. Normal	111,1	1,23

### Ejemplo 4

#### *Determinación de resistencia a APC utilizando Protac®*

55 El tiempo de coagulación se determinó con un coagulómetro KC4 (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40  $\mu\text{l}$  de plasma deficiente en FV, 10  $\mu\text{l}$  de muestra de plasma y 50  $\mu\text{l}$  de 2 U/ml de Protac®, 1 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 20 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50  $\mu\text{l}$  de activador de la protrombina 5  $\mu\text{g/ml}$ , procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 25 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Tabla 5A), sin aditivos (Tabla 5B), o en 15 mM de EDTA (Tabla 5C). Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación se determinó en presencia y en ausencia de Protac®. Se obtuvo un cociente entre el tiempo de coagulación con Protac® y el tiempo de coagulación sin Protac®.

65 Los resultados obtenidos muestran que la relación disminuye enormemente por la adición de iones de calcio en muestras de plasma normal, y que apenas se puede distinguir entre muestras de plasma normal y muestras de plasma con defecto de FV heterocigótico. Sorprendentemente, la adición de EDTA aumenta considerablemente la sensibilidad entre muestras de plasma normal, heterocigótico y homocigótico (Figura 2).



ES 2 239 388 T3

TABLA 5

<b>A</b>			
Muestra de plasma	Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
1. Defecto de FV heterocigótico	28,3	27,9	1,01
2. Defecto de FV heterocigótico	31,9	31,5	1,01
3. Defecto de FV heterocigótico	26,0	26,3	0,99
4. Defecto de FV heterocigótico	26,1	25,9	1,01
5. Defecto de FV heterocigótico	43,5	41,7	1,04
6. Normal	31,9	27,4	1,16
7. Normal	34,1	29,7	1,15
8. Normal	37,0	31,2	1,19
9. Normal	37,8	31,4	1,20
10. Normal	37,5	31,4	1,19
11. Normal	46,3	35,8	1,29
12. Normal	50,9	39,9	1,28
<b>B</b>			
Muestra de plasma	Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
1. Defecto de FV heterocigótico	65,5	50,9	1,29
2. Defecto de FV heterocigótico	89,5	63,8	1,40
3. Defecto de FV heterocigótico	55,0	46,6	1,18
4. Defecto de FV heterocigótico	53,5	44,2	1,21
5. Defecto de FV heterocigótico	125,7	82,8	1,52
6. Normal	103,1	46,0	2,24
7. Normal	94,6	42,1	2,25
8. Normal	114,4	47,7	2,40
9. Normal	114,2	47,9	2,38
10. Normal	101,4	47,0	2,16
11. Normal	134,4	54,3	2,47
12. Normal	139,0	62,6	2,22
<b>C</b>			
Muestra de plasma	Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
1. Defecto de FV homocigótico	44,7	53,6	0,83
2. Defecto de FV homocigótico	57,6	79,9	0,72
1. Defecto de FV heterocigótico	135,6	82,1	1,65
2. Defecto de FV heterocigótico	205,4	119,0	1,73
3. Defecto de FV heterocigótico	101,2	77,9	1,30
6. Defecto de FV heterocigótico	96,9	69,1	1,40
7. Defecto de FV heterocigótico	332,9	186,6	1,78
8. Normal	258,8	76,1	3,40
9. Normal	196,8	62,5	3,15
10. Normal	250,1	77,0	3,25
11. Normal	262,5	81,2	3,23
12. Normal	230,1	73,1	3,15
13. Normal	307,5	88,5	3,47
14. Normal	342,8	109,5	3,13

## Ejemplo 5

*Determinación de resistencia a APC utilizando APC*

5 El tiempo de coagulación se determinó mediante un coagulómetro KC4 micro (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40  $\mu$ l de plasma deficiente en FV, 10  $\mu$ l de muestra de plasma y 50  $\mu$ l de 10 U/ml de APC, 10 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 8 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50  $\mu$ l de activador de la protrombina 5  $\mu$ g/ml, procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 15 mM de EDTA. Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación se determinó en presencia y en ausencia de APC. Se obtuvo un cociente entre el tiempo de coagulación con APC y el tiempo de coagulación sin APC.

15 Los resultados obtenidos muestran que la adición exógena de APC puede acortar la incubación sin pérdida de sensibilidad en el sistema de ensayo. Los plasmas normales se pueden separar, en cada caso, de los plasmas heterocigóticos. En este ejemplo también, no se añaden iones de calcio.

TABLA 6

Muestra de plasma	Tiempo de coagulación + APC [s]	Tiempo de coagulación - APC [s]	Relación +/- APC
1. Normal	126,0	43,0	2,93
2. Defecto de FV heterocigótico	64,7	45,0	1,44
3. Defecto de FV heterocigótico	68,8	47,0	1,46
4. Defecto de FV heterocigótico	67,3	45,3	1,49

## Ejemplo 6

*Activadores de la protrombina dependientes o independientes de FV procedentes de venenos de serpiente*

35 El tiempo de coagulación se determinó con un coagulómetro KC4 micro (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40  $\mu$ l de plasma deficiente en FV, 10  $\mu$ l de muestra de plasma y 50  $\mu$ l de 2 U/ml de Protac<sup>®</sup>, 1 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 20 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50  $\mu$ l de veneno de serpiente no purificado 5-50  $\mu$ g/ml, procedente de serpientes, con activadores de la protrombina dependientes de FV e independientes de FV, en 15 mM de EDTA, o activador de la protrombina purificado 5  $\mu$ g/ml, en 15 mM de EDTA. Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación se determinó en presencia y en ausencia de Protac<sup>®</sup>. Se obtuvo un cociente entre el tiempo de coagulación con Protac<sup>®</sup> y el tiempo de coagulación sin Protac<sup>®</sup> (Tabla 7).

45 Los resultados muestran cómo los activadores de la protrombina dependientes de FV purificados, o los venenos de serpiente brutos con activadores de la protrombina dependientes de FV, se pueden utilizar para la determinación de la resistencia a APC. Los activadores de la protrombina dependientes de FV conducen a una relación con la cual es posible distinguir muestras de plasma con resistencia a APC y plasma normal.

TABLA 7

*Muestras de plasma normal*

Venenos de serpiente dependientes de FV o activadores de la protrombina purificados*	Tiempo de coagulación + Protac <sup>®</sup> [s]	Tiempo de coagulación - Protac <sup>®</sup> [s]	Relación +/- Protac <sup>®</sup>
1. <i>Notechis ater occidentalis</i> (25 $\mu$ g/ml)	166,7	70,8	<b>2,35</b>
2. <i>Notechis ater niger</i> (25 $\mu$ g/ml)	305,2	105,7	<b>2,89</b>
3. <i>Notechis ater humphreysi</i> (25 $\mu$ g/ml)	152,6	60,5	<b>2,52</b>
4. <i>Notechis ater serventyi</i> (25 $\mu$ g/ml)	179,5	59,7	<b>3,01</b>
5. <i>Pseudechis porphyriacus</i> (50 $\mu$ g/ml)	390,0	144,6	<b>2,70</b>
6. <i>Holocephalus stephensii</i> (50 $\mu$ g/ml)	208,4	78,1	<b>2,67</b>
7. * <i>Tropidechis carinatus</i> (5 $\mu$ g/ml)	135,6	55,2	<b>2,46</b>

## ES 2 239 388 T3

### *Defecto de FV heterocigótico*

Venenos de serpiente dependientes de FV o activadores de la protrombina purificados*		Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
<i>Notechis ater occidentalis</i>	(25 µg/ml)	122,8	80,3	<b>1,53</b>
<i>Notechis ater niger</i>	(25 µg/ml)	137,3	90,9	<b>1,51</b>
<i>Notechis ater humphreysi</i>	(25 µg/ml)	78,5	60,3	<b>1,30</b>
<i>Notechis ater serventyi</i>	(25 µg/ml)	79,8	61,3	<b>1,30</b>
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	(50 µg/ml)	204,8	158,1	<b>1,30</b>
<i>Holocephalus stephensii</i>	(50 µg/ml)	114,6	82,4	<b>1,39</b>
* <i>Tropidechis carinatus</i>	(5 µg/ml)	94,9	65,4	<b>1,45</b>

### *Muestras de plasma normal*

Venenos de serpiente independientes de FV o activadores de la protrombina purificados*		Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
<i>Akgistrodon rhodostoma</i> (4)	(25 µg/ml)	51,5	57,5	<b>0,90</b>
<i>Crotalus adamanteus</i> (12)	(25 µg/ml)	70,8	77,2	<b>0,92</b>
<i>Oxyuranus scutellatus</i> (307)	(25 µg/ml)	21,9	21,7	<b>1,01</b>
<i>Oxyuranus microlepidotus</i> (337)	(25 µg/ml)	19,0	19,3	<b>0,98</b>
<i>Pseudonaja textilis</i>	(25 µg/ml)	7,8	7,7	<b>1,01</b>
	(5 µg/ml)	21,0	21,4	<b>0,98</b>
<i>Bothrops neuwiedi</i>	(25 µg/ml)	157,8	160,9	<b>0,98</b>
* <i>Ecarin</i>	(5 µg/ml)	> 600	> 600	-
* <i>Oxyuranus scutellatus</i>	(5 µg/ml)	21,0	21,0	<b>1,00</b>
* <i>Textarin</i> ®	(5 µg/ml)	> 600	> 600	-

### *Defecto de FV heterocigótico*

Venenos de serpiente independientes de FV o activadores de la protrombina purificados*		Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
<i>Akgistrodon rhodostoma</i>	(25 µg/ml)	50,8	53,5	<b>0,95</b>
<i>Crotalus adamanteus</i>	(25 µg/ml)	65,2	74,6	<b>0,87</b>
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	(25 µg/ml)	26,5	25,8	<b>1,03</b>
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	(25 µg/ml)	18,2	19,6	<b>0,93</b>
<i>Pseudonaja textilis</i>	(5 µg/ml)	21,2	21,6	<b>0,98</b>
<i>Bothrops neuwiedi</i>	(25 µg/ml)	155,9	154,5	<b>1,01</b>
* <i>Ecarin</i>	(5 µg/ml)	> 600	> 600	-
* <i>Oxyuranus scutellatus</i>	(5 µg/ml)	21,0	20,8	<b>1,01</b>
* <i>Textarin</i> ®	(5 µg/ml)	> 600	> 600	-

#### Ejemplo 7

#### *Influencia de diferentes agentes quelatantes sobre el sistema de ensayo*

El tiempo de coagulación se determinó mediante un coagulómetro KC4 (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40 µl de plasma deficiente en FV, 10 µl de muestra de plasma y 50 µl de 2 U/ml de Protac®, 1 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 20 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50 µl de

## ES 2 239 388 T3

activador de la protrombina 5 µg/ml, procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 15 mM de EDTA, citrato u oxalato. Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación se determinó en presencia y en ausencia de Protac®. Se obtuvo un cociente entre el tiempo de coagulación con Protac® y el tiempo de coagulación sin Protac® (Tabla 8).

5 El resultado muestra que la adición de diferentes agentes quelatantes intensifica la dependencia de FV.

TABLA 8

	Tiempo de coagulación + Protac® [s]	Tiempo de coagulación - Protac® [s]	Relación +/- Protac®
1. 15 mM de EDTA	162,1	62,5	2,59
2. 15 mM de citrato	115,4	55,8	2,07
3. 15 mM de oxalato	92,8	49,1	1,89
4. sin aditivos	76,4	46,3	1,65

20 Ejemplo 8

### *Determinación de resistencia a APC utilizando un sustrato cromogénico*

25 La variación de la extinción por minuto se determinó fotométricamente a 405 nm (Perkin Elmer UV/VIS LAMBDA BIO 10). Se incubaron 40 µl de plasma deficiente en FV, 10 µl de muestra de plasma y 50 µl de APC 10 µg/ml, 10 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina durante 8 minutos a 37°C. En una segunda etapa, después de los 8 minutos, a 37°C, se añadieron 50 µl de la mezcla activada anterior a 750 µl de 50 mM de Hepes, pH 7,5, 100 µl de 4 mM de Tos-Gly-Pro-Arg-pNA-AcOH (Pefachrom TH) y 100 µl de activador de la protrombina 5 µg/ml procedente de veneno de *Notechis scutatus scutatus*, y la variación de la extinción se midió a 405 nm (Tabla 9). Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, 15 mM de EDTA a pH 7,5. Las mediciones se toman en presencia y en ausencia de APC. Nuevamente se obtiene una relación a partir de la variación de la extinción por minuto, sin APC (- APC) y con APC (+ APC).

35 La conversión del sustrato cromogénico se reduce de forma más importante en plasma normal en presencia de APC, puesto que, en este caso, el FV normal se descompone mediante APC y de este modo se forma menos trombina que divide al sustrato cromogénico. En consecuencia, la variación de la extinción por minuto en el plasma normal, en presencia de APC, es menor que en presencia de resistencia a APC.

40 Los resultados obtenidos muestran que la determinación cromogénica de resistencia a APC también es posible según la invención, y que en cada caso los plasmas normales se pueden distinguir de los plasmas heterocigóticos. En este ejemplo también, es innecesaria la adición de iones de calcio.

TABLA 9

	Plasma normal		FV Leiden heterocigótico	
	+ APC	- APC	+ APC	- APC
ΔE /min.	0,036	0,115	0,105	0,183
Cociente (- APC / + APC)	3,18		1,74	

50 Ejemplo 9

### *Influencia de heparina sobre el sistema de ensayo*

55 El tiempo de coagulación se determinó con un coagulómetro KC4 micro (Amelung, Lemgo, Alemania). Se incubaron 40 µl de plasma deficiente en FV (con o sin polibreno), 10 µl de muestra de plasma y 50 µl de 2 U/ml de Protac®, 1 U/ml de RVV-V y 0,1 mg/ml de cefalina, durante 20 minutos a 37°C. La coagulación se desencadenó mediante adición de 50 µl de activador de la protrombina 5 µg/ml, procedente del veneno de *Notechis scutatus scutatus*, en 15 mM de EDTA. Todos los reactivos se disolvieron en 50 mM de Hepes, pH 7,5. El tiempo de coagulación se determinó en presencia y en ausencia de Protac®. Se obtuvo un cociente entre el tiempo de coagulación con Protac® y el tiempo de coagulación sin Protac® (Tabla 8).

65 Los resultados muestran que la heparina, en concentraciones terapéuticas, en el ensayo presentado, no tiene influencia sobre la relación. La adición de polibreno al plasma deficiente en FV tampoco influye en la relación, pero los tiempos de coagulación se prolongan por ello.

ES 2 239 388 T3

TABLA 10

*Muestras de plasma sin heparina*

Sonda de plasma	Plasma deficiente en FV, sin antagonista de la heparina			Plasma deficiente en FV, con antagonista de la heparina (Chromogenix®)		
	+ Protac	- Protac	Cociente	+ Protac	- Protac	Cociente
Defecto de FV heterocigótico	127,0	56,4	2,25	185,4	80,9	2,29
Defecto de FV heterocigótico				70,6	65,9	1,07
Defecto de FV heterocigótico				60,5	59,4	1,02
Defecto de FV heterocigótico				81,2	69,8	1,16
Defecto de FV heterocigótico				103,4	78,6	1,32
Defecto de FV heterocigótico				124,9	94,5	1,32
Defecto de FV heterocigótico				92,8	69,9	1,65

*Plasma heparinizado*

(0,5 ó 1,0 UI de heparina/ml de muestra de plasma)

Muestra de plasma	Plasma deficiente en FV, sin antagonista de la heparina			Plasma deficiente en FV, con antagonista de la heparina		
	+ Protac	- Protac	Cociente	+ Protac	- Protac	Cociente
Defecto de FV heterocigótico						
0,5 UI de heparina	70,3	55,8	1,26	84,9	66,8	1,27
1,0 UI de heparina	70,9	56,6	1,25	102,2	73,0	1,40
Defecto de FV heterocigótico						
0,5 UI de heparina	88,1	62,2	1,42	113,7	83,9	1,36
1,0 UI de heparina	86,8	62,2	1,40	119,3	83,0	1,44
Normal						
0,5 UI de heparina	170,4	61,6	2,77	206,3	84,2	2,45
1,0 UI de heparina	179,0	62,4	2,87	206,3	92,1	2,24

## REIVINDICACIONES

- 5 **caracterizado** porque comprende incubar una muestra de plasma con un activador de la proteína C y/o con APC, desencadenar la coagulación mediante adición de un activador de la protrombina independiente de calcio, pero dependiente de FV, sin adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la mezcla de ensayo, medir el tiempo de coagulación, comparar este último con el tiempo de coagulación con o sin activador de la proteína C y/o APC de una muestra de plasma de referencia, y detectar la perturbación en el sistema de la proteína C a partir de esto.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el plasma de referencia es un plasma normal.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el plasma de referencia es una parte de la muestra de plasma a investigar.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el trastorno en el sistema de la proteína C se detecta formando un cociente con el tiempo de coagulación de la muestra de plasma y del plasma de referencia.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la medición se realiza con sustratos sintéticos cromogénicos, fluorogénicos o amperogénicos.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque las muestras de plasma utilizadas se trataron previamente con citrato, oxalato o EDTA.
- 25 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el activador de la proteína C es un veneno, o al menos una fracción de veneno, procedente de las serpientes *Agkistrodon contortrix* y sus subespecies, *Agkistrodon piscivorus* y sus subespecies, *Agkistrodon bilineatus* y sus subespecies y/o *Agkistrodon halys* y sus subespecies.
- 30 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el activador de la proteína C utilizado es Protac®.
- 35 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el activador de la protrombina es un veneno de serpiente con actividad activadora de la protrombina, independiente de calcio, en forma de un veneno bruto o de una fracción de veneno bruto purificada, o un activador de la protrombina independiente de calcio procedente de microorganismos con genomas naturales o recombinantes.
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el veneno de serpiente con actividad activadora de la protrombina, independiente de calcio, es un veneno procedente de la especie de *Elapidae*, a partir de las serpientes *Notechis scutatus scutatus*, *Notechis ater niger*, *Notechis ater humphreysi*, *Notechis ater serventyi*, *Notechis flinders*, *Notechis occidentalis*, *Tropidechis carinatus*, *Cryptophis nigrescens*, *Hoplocephalus stephensii* y/o *Pseudochis prophiriacus*.
- 45 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque comprende añadir, a la mezcla de ensayo, fosfolípidos, proteína C, agentes quelatantes o análogos de agentes quelatantes, plasma deficiente, proteína S, factor VIII, un activador del factor V, y/o antagonistas de la heparina.
- 50 12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque comprende añadir, a la mezcla de ensayo, plasma deficiente en factor V, en proteína C o en proteína S, como el plasma deficiente.
13. Procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizado** porque el plasma deficiente se utiliza en cantidades de 99% a 1% hasta 50% a 50%, en relación con la muestra de plasma.
- 55 14. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el activador del factor V es RVV-V procedente de *Vipera russelli*.
15. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el antagonista de la heparina es bromuro de hexadimetrina, sulfato de protamina, o una enzima que divide a la heparina.
- 60 16. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el agente quelatante es citrato, oxalato, EGTA y/o EDTA.
- 65 17. Utilización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, para la detección cualitativa y/o la determinación cuantitativa de factor V de coagulación de la sangre activado, con aumento de la estabilidad frente a la descomposición mediante proteína C activada en una muestra de plasma en caso de FV Leiden.
18. Kit de ensayo para aplicar el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** por-

## ES 2 239 388 T3

que comprende APC o un activador de la proteína C, un activador de la protrombina independiente de calcio pero dependiente de FV, y opcionalmente un activador del factor V.

5 19. Kit de ensayo según la reivindicación 18, **caracterizado** porque comprende Protac® como el activador de la proteína C.

20. Kit de ensayo según la reivindicación 18 ó 19, **caracterizado** porque comprende fosfolípidos, plasma deficiente en factor V, un agente complejante de Ca y, opcionalmente uno o más plasmas de referencia.

10 21. Kit de ensayo según la reivindicación 20, **caracterizado** porque comprende EDTA como agente complejante de Ca.

15 22. Utilización del kit de ensayo según una de las reivindicaciones 18 a 21 para la detección cualitativa y/o la determinación cuantitativa de factor V de coagulación de la sangre activado, con aumento de la estabilidad frente a la descomposición mediante proteína C activada en una muestra de plasma, en caso de factor V Leiden, o de trastornos en el sistema de la proteína C o de la proteína S.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

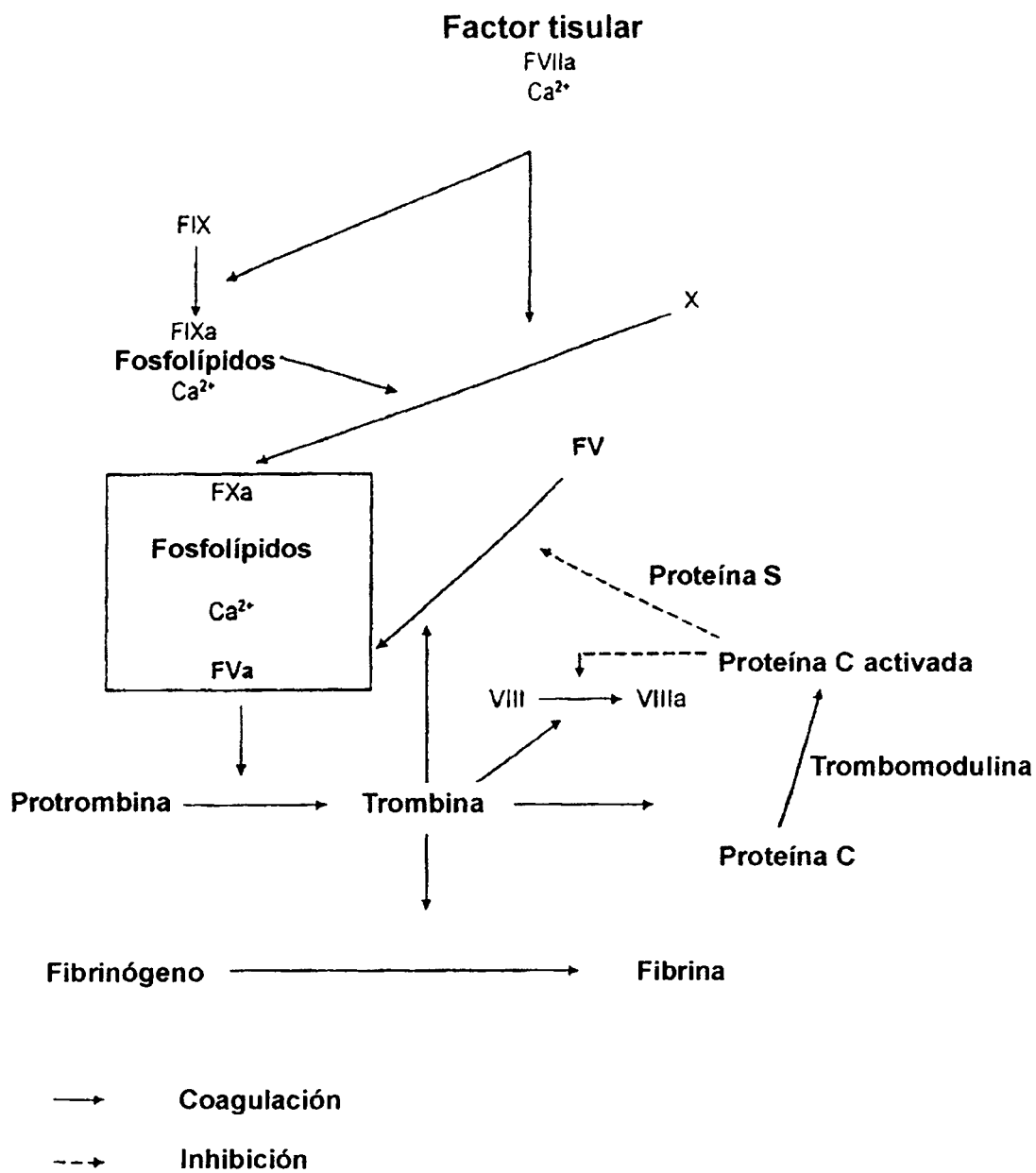
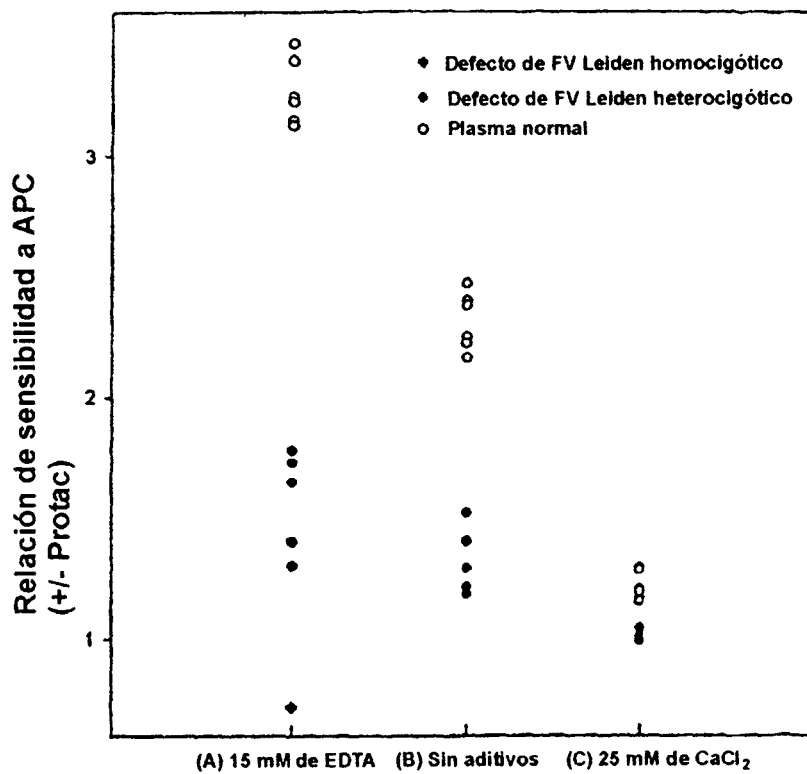


Figura 1



Figura 2



**Representación de la relación de sensibilidad para determinar la resistencia a APC**