

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 855**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/554 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007** **E 07017837 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 1903106**

54 Título: **Método para la elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinables y su utilización**

30 Prioridad:

25.09.2006 DE 102006045550

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2013

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
GÖRZHÄUSER HOF, EMIL-VON-BEHRING-
STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

PATZKE, JÜRGEN, DR.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 434 855 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinables y su utilización

La presente invención se encuentra en el área del diagnóstico, particularmente del diagnóstico de coagulación, y hace referencia a un método para la elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinantes, y a su utilización en métodos de prueba de diagnóstico, que comprenden una reacción de aglutinación, como por ejemplo, en un método para la determinación de la actividad del VWF.

El factor de Willebrand (VWF) es una glicoproteína multimérica de elevado peso molecular, que presenta funciones importantes en el proceso de la hemostasia primaria. En el caso de un daño vascular, el VWF cumple con tres tareas esenciales: Dicho factor logra la adhesión de los trombocitos en el subendotelio, logra la agregación de los trombocitos entre sí, y de esta manera favorece la conformación de un trombo, y con el factor plasmático de coagulación sanguínea VIII (F VIII) conforma un complejo que protege el factor FVIII ante una descomposición anticipada. Mediante la trombina, FVIII se disocia del complejo de F VIII-VWF, y se activa para obtener F VIIIa, y de esta manera logra su actividad procoagulante que se indica frecuentemente también como F VIII:C.

El síndrome de Willebrand se genera debido a trastornos cualitativos o cuantitativos del VWF, y es una de las afecciones hemorrágicas hereditarias más frecuentes. Para el diagnóstico de un síndrome de Willebrand, se encuentran a disposición diferentes métodos de prueba, como por ejemplo, la determinación del tiempo de hemorragia (BT), métodos cuantitativos para la determinación de la concentración de antígeno de VWF (VWF:Ag), como por ejemplo, métodos de ELISA, así como métodos para la determinación de la actividad del VWF, como por ejemplo, la aglutinación de plaquetas inducida por la ristocetina (VWF:RCo).

El método de la aglutinación de plaquetas inducida por la ristocetina, que se denomina también prueba del cofactor de ristocetina, detecta defectos funcionales de la proteína del VWF que no se detectan con los métodos cuantitativos para la determinación de la concentración del antígeno del VWF. Por consiguiente, la ejecución de una prueba del cofactor de ristocetina, para la determinación de la actividad del cofactor de ristocetina, resulta necesaria para el diagnóstico completo de un síndrome de Willebrand. Convencionalmente, la prueba del cofactor de ristocetina se realiza en tanto que se mezcla una muestra de plasma de un paciente, con trombocitos. Convencionalmente, para dicha prueba se utilizan trombocitos humanos fijados. Sin embargo, también se pueden utilizar trombocitos fisiológicamente activos, es decir, trombocitos nativos. Después de la adición de ristocetina, los trombocitos nativos realizan la agregación, o bien los trombocitos fijados realizan la aglutinación en relación con el VWF activo existente en la muestra. La reacción de la agregación, o bien de la aglutinación, se puede detectar de manera óptica, por ejemplo, mediante la medición del incremento de la transmisión, y de esta manera permite una cuantificación de la actividad del VWF:RCo. Sin embargo, la determinación de la reacción de la agregación, o bien de la aglutinación de todos los trombocitos, se encuentra ligada a algunas desventajas.

Por una parte, resulta una desventaja la necesidad de mezclar permanentemente la mezcla de reacción durante el registro óptico de los valores de medición. Es probable que el mezclado continuo resulte necesario para incrementar la frecuencia de colisión de los trombocitos y, de esta manera, para incrementar la velocidad de reacción. Sólo pocos equipos automatizados utilizados en los laboratorios modernos para el diagnóstico de hemostasia, disponen de dispositivos técnicos que permiten un mezclado continuo de esta clase, de la mezcla de reacción durante la medición. Por otra parte, la clásica prueba del cofactor de ristocetina, presenta una imprecisión relativamente elevada. Dado que la mayor parte de los equipos automatizados del área para el diagnóstico de hemostasia, se encuentran equipados con dispositivos ópticos que permiten sólo la medición de longitudes de onda en el rango visible, también se debería poder evaluar un método de prueba automatizado en dicho rango de longitud de onda. Durante la medición de la transmisión, debido a la aglutinación de trombocitos, sólo la formación de agregados de gran tamaño, genera un incremento de la transmisión en el rango visible de longitud de onda. Sin embargo, la formación de agregados de gran tamaño, que también resultan susceptibles a las interferencias mecánicas, no se puede detectar de manera precisa en las cubetas de prueba convencionales, relativamente reducidas, con ventanas de medición ópticas reducidas en correspondencia. Por consiguiente, las curvas de la reacción de la agregación de trombocitos, así como de la aglutinación de trombocitos, presentan convencionalmente una fluctuación considerable de los valores de medición.

Anteriormente se han desarrollado algunos métodos de prueba alternativos, que permiten una determinación precisa de la actividad del VWF:RCo. En algunos de dichos métodos, se utiliza el receptor de VWF GP1b o fragmentos de dicho receptor. De esta manera se han desarrollado, por ejemplo, los métodos de ELISA, que determinan el enlace del VWF inducido por la ristocetina, con el receptor GP1b. Un método de esta clase se describe, por ejemplo, en la bibliografía Federici, A. B. y otros (Haematologica 2004; 89(1), 77-85), así como en la patente WO 01/02853 A2. Otro formato de prueba utiliza fases portadoras particulares, como por ejemplo, partículas de látex o liposomas (por ejemplo, Kitaguchi, T. y otros, Comunicación de investigación bioquímica y biofísica. 1999; 261(3):784-789), a los cuales se acopla proteína GP1b. Las partículas asociadas al GP1b, se aglutinan en presencia de ristocetina y VWF activo.

En el método anteriormente mencionado, resulta desventajosa la elaboración de las fases sólidas asociadas al GP1b, que implica tiempos y costes elevados, que convencionalmente precede la depuración de la proteína de GP1b nativa o expresada de manera recombinada. Además, al menos, para la realización de algunos formatos de prueba, se debe disponer adicionalmente de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de GP1b. En resumen, se trata de métodos complejos para los cuales se debe elaborar un serie de reactivos especiales.

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un agente que en lugar de los trombocitos nativos o fijados, se pueda utilizar en una prueba de aglutinación, y que permita una determinación precisa fotométrica de la reacción de aglutinación, en el caso de longitudes de onda en el rango visible.

Se ha descubierto que los fragmentos de trombocitos que se obtienen mediante un método, en el que en primer lugar se tratan con ultrasonido trombocitos nativos y a continuación se fijan, disponen de una capacidad de aglutinación que permite la utilización de los fragmentos de trombocitos en una prueba de aglutinación.

En el estado del arte, se conocen diferentes métodos para la elaboración de fragmentos de trombocitos. En la literatura, los fragmentos de trombocitos también se denominan microvesículas o micropartículas. En el caso de la elaboración mecánica de membranas de plaquetas, por ejemplo, mediante un tratamiento con ultrasonido, congelación/descongelación o cavitación con nitrógeno, se generan partículas de diferentes tamaños (Authi, K. S: Preparación de plaquetas humanas altamente purificadas, plasma y membranas intracelulares, mediante la utilización de electroforesis de flujo libre de alto voltaje, y métodos para el estudio de regulación de Ca²⁺. Capítulo 5 en Plaquetas - A Enfoque práctico, 1996, Hrsg. Steve P. Watson & Kalwant S. Authi, Prensa de la Universidad de Oxford, Reino Unido, y Lee, D.H. & Blajchman, M.A.: Sustitutos de plaquetas y nuevos métodos de preservación de plaquetas. Capítulo 60 en Plaquetas, 2002, Hrsg. Alan D. Michelson, Prensa Académica, Elsevier Science, Estados Unidos). Mediante la composición heterogénea de esta clase de preparaciones, la utilización de esta clase de fragmentos de trombocitos en una prueba de aglutinación, resulta menos prometedora, dado que se requieren partículas de igual tamaño y con iguales propiedades de superficie. Además, los métodos conocidos implican frecuentemente tiempos y costes considerables, dado que dichos métodos comprenden una pluralidad de etapas de trabajo. Con frecuencia, los trombocitos se incuban con inhibidores para evitar una activación excesiva de los trombocitos, y para proteger dichos trombocitos ante la agresión de enzimas degradantes.

Un método para la elaboración de fragmentos de trombocitos con fines farmacéuticos, se describe en la declaración de patente US 5,185,160. En este caso, en primer lugar se desintegran las plaquetas, mediante una congelación y una descongelación reiteradas, y finalmente se incuban durante 20 horas a 60 °C para la inactivación de las posibles contaminaciones virales. Para la disolución del precipitado obtenido durante la incubación, dicho precipitado se somete a un tratamiento con ultrasonido. Después de la centrifugación de la preparación tratada de esta manera, el sobrenadante contiene los fragmentos de trombocitos farmacéuticamente compatibles, que debido a sus propiedades procoagulantes se pueden utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de pacientes con una afección hemorrágica.

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para la elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinables, en donde en primer lugar se tratan trombocitos nativos con ultrasonido, y se fijan después de dicho tratamiento con ultrasonido.

Por el término "fragmentos de trombocitos aglutinables", se entienden fragmentos de trombocitos que ante la presencia de VWF activo, son capaces de lograr una reacción de aglutinación. La capacidad de aglutinación de fragmentos de trombocitos humanos, se puede comprobar, por ejemplo, en tanto que los fragmentos de trombocitos se mezclan con plasma bovino para lograr una mezcla de reacción, en donde el plasma bovino se utiliza como fuente para VWF bovino. Un incremento de la transmisión de la mezcla de reacción, en donde el incremento de la transmisión se determina preferentemente mediante longitudes de onda del rango visible, es un indicio inequívoco de una reacción de aglutinación existente y, de esta manera, de la capacidad de aglutinación de los fragmentos de trombocitos. De manera alternativa, para la comprobación de la capacidad de agregación, los fragmentos de trombocitos se mezclan con plasma humano y ristocetina para obtener una mezcla de reacción.

Los trombocitos que se utilizan como material base en el método conforme a la presente invención, pueden ser de origen animal o humano. La elaboración de trombocitos nativos se puede realizar, por ejemplo, mediante sedimentación a partir de sangre total o plasma rico en plaquetas. Preferentemente, antes del tratamiento con ultrasonido, los trombocitos se resuspenden en una solución tampón, por ejemplo, en una solución tamponada con fosfato, TRIS o imidazol. Preferentemente, como material base se utiliza una suspensión de trombocitos que contiene alrededor de 0,5 a 2×10^6 , de manera particularmente preferente alrededor de 1×10^6 trombocitos por microlitro.

De manera ventajosa, la solución tampón en la cual se encuentran resuspendidos los trombocitos, contiene un anticoagulante. Los anticoagulantes preferidos son el citrato de sodio, citrato/ácido cítrico de glucosa, ácido/ácido cítrico de glucosa, EDTA, EGTA, heparina, derivados de heparina, pentasacáridos sintéticos, como por ejemplo,

fondaparinux o hirudina. El anticoagulante no debe ser un componente de la solución tampón. También se puede adicionar por separado a la suspensión de trombocitos.

5 El tratamiento con ultrasonido para la fragmentación de los trombocitos nativos, se realiza preferentemente en tanto que una suspensión de trombocitos nativos se somete de manera suficiente a un ultrasonido potente. Dicho proceso se puede realizar, por ejemplo, mediante una intensidad elevada de ultrasonido, mediante la utilización de una sonda de ultrasonido y con un periodo de tiempo del tratamiento prolongado en correspondencia. La intensidad y la duración necesarias se deben determinar mediante el respectivo generador de ultrasonidos y los volúmenes utilizados. Se prefieren los tratamientos con ultrasonido, comparables con un tratamiento con ultrasonido que se realiza con una sonda de ultrasonido Branson Sonifier 250 (Branson Danbury, Estados Unidos) y los siguientes
10 ajustes: ciclo de trabajo: 100 %, control de rendimiento: 7. Preferentemente, antes, durante y después del tratamiento con ultrasonido, los trombocitos, o bien los fragmentos de trombocitos, se enfrían permanentemente, por ejemplo, mediante el almacenamiento en un baño de hielo.

15 Después del tratamiento con ultrasonido, se fijan los fragmentos de trombocitos. De manera ventajosa, la etapa de fijación se realiza directamente a continuación del tratamiento con ultrasonido, es decir, sin retrasos de tiempo. La fijación de los fragmentos de trombocitos tratados con ultrasonidos, se realiza preferentemente en tanto que a la suspensión de fragmentos de trombocitos tratada con ultrasonido, se adiciona un agente fijador que logra una entrecruzamiento transversal. Los agentes fijadores particularmente apropiados son, por ejemplo, el formaldehído, paraformaldehído o glutaraldehído. En una forma de ejecución preferida del método, a la suspensión de fragmentos de trombocitos tratada con ultrasonido, se adiciona formaldehído con una concentración final del 1 %, y la
20 suspensión se incuba alrededor de 6 a 16 horas a aproximadamente 2 a 8 °C.

25 En una forma de ejecución preferida, se realizan tanto el tratamiento de ultrasonido de los trombocitos, así como la etapa de fijación a continuación, en presencia de un anticoagulante. Dicho proceso se puede lograr, por ejemplo, mediante la adición de un anticoagulante a la suspensión de trombocitos, antes del tratamiento con ultrasonido, como se ha descrito anteriormente, y a continuación, después del tratamiento con ultrasonido, se adiciona un agente fijador sin una etapa de lavado.

30 En otra forma de ejecución preferida, se realizan tanto el tratamiento con ultrasonido de los trombocitos, así como la etapa de fijación a continuación, en ausencia de un inhibidor de la función de los trombocitos. Los inhibidores de la función de los trombocitos, que preferentemente no se adicionan a la suspensión de trombocitos o bien, a la suspensión de fragmentos de trombocitos, comprenden, por ejemplo, inhibidores de ciclooxigenasa (como por ejemplo, ácido acetilsalicílico), inhibidores de fosfodiesterasa (como por ejemplo, teofilina, cafeína, dipiridamol, milrinona, cilostamida, zaprinast), agentes que incrementan el nivel de cAMP (como por ejemplo, prostaglandina E1, prostaglandina 12, prostaciclina, adenosina), así como enzimas que degradan el ADP (como por ejemplo, apirasa).

35 Después de la fijación, convencionalmente el agente fijador se retira de la suspensión, por ejemplo, mediante un proceso de diálisis, preferentemente con una solución tampón de fosfato. Preferentemente, se realiza un proceso de diálisis hasta que la concentración del agente fijador sea menor a 0,001 % en la suspensión.

40 En una forma de ejecución preferida, se enriquecen fracciones particularmente ventajosas de los fragmentos de trombocitos elaborados conforme a la presente invención, mediante la centrifugación de la suspensión de fragmentos de trombocitos. El enriquecimiento se puede realizar mediante la centrifugación de la suspensión de fragmentos de trombocitos en una primera etapa de centrifugación en el caso de 1500 g durante 10 minutos, y mediante la centrifugación del sobrenadante resultante, en una segunda etapa de centrifugación en el caso de 4000 g durante 40 minutos. El sobrenadante se elimina y los fragmentos de trombocitos sedimentados se resuspenden en una solución tampón, preferentemente una solución tampón de fosfato. Preferentemente, las etapas de centrifugación se realizan a una temperatura de alrededor de 20 °C.

45 Otra forma de ejecución del método conforme a la presente invención, para la elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinables, comprende una etapa adicional del método en la que después de la etapa de fijación, se combina la proteína del receptor GP1b con los fragmentos de trombocitos. GP1b es una glicoproteína que es un componente integral de la membrana de trombocitos, y que participa del enlace del VWF con la superficie de los trombocitos. En el caso de la proteína de GP1b que se combina con los fragmentos de trombocitos fijados, se puede tratar de una proteína de GP1b aislada, nativa, es decir, obtenida a partir de fuentes naturales, como por ejemplo, de plasma, o se puede tratar de una proteína de GP1b elaborada de manera recombinante. En el sentido de la presente
50 invención, el término "proteína de GP1b" comprende tanto la proteína completamente nativa o recombinante, así como fragmentos de dichas proteínas, particularmente fragmentos N-terminales, que comprenden los ésteres de aminoácidos 1-290 (subunidad GP1b α).

55 Para el enlace de la proteína de GP1b con los fragmentos de trombocitos, se pueden utilizar, por ejemplo, uno o una pluralidad de anticuerpos, a los cuales se ha acoplado la proteína de GP1b, y que enlazan con los epítomos de la superficie de los trombocitos, como proteínas o lípidos. Los epítomos de la superficie de los trombocitos apropiados para el enlace de anticuerpos acoplados al GP1b, son, por ejemplo, GPIIb, GPIIIa, GPIa, GPVI, fosfatidilcolina y/o

fosfatidilserina. Preferentemente se utilizan anticuerpos acoplados al GP1b, cuya fracción de GP1b es capaz también de enlazar VWF. Para el acoplamiento de GP1b a anticuerpos apropiados, se pueden utilizar una pluralidad de métodos conocidos. Para lograr un enlace estable de un complejo de GP1b y anticuerpos, con la superficie de los fragmentos de trombocitos, se pueden utilizar también diferentes métodos conocidos que permitan una entrecruzamiento transversal con proteínas u otras moléculas de la superficie de los fragmentos de trombocitos.

La proteína de GP1b se puede enlazar también de manera química a los fragmentos de trombocitos, o mediante la utilización de moléculas mediadoras, como por ejemplo, proteínas que establecen un enlace entre la proteína de GP1b y una molécula de la superficie del fragmento. Por ejemplo, la proteína de GP1b se puede acoplar a la anexina V, que enlaza con la fosfatidilserina. La fosfatidilserina, en el caso de trombocitos activos y de los fragmentos obtenidos a partir de dichos trombocitos, se encuentra particularmente en la superficie. Otros ejemplos de las moléculas mediadoras son las moléculas "entrecruzadoras" conocidas por el experto en el arte, como por ejemplo, bis-sulfosuccinimidil-suberato (polietilenglicol 5), bis-N-succinimidil-pentaetilenglicol-éster y una pluralidad de otras moléculas, con las cuales se pueden enlazar las proteínas entre sí. La utilización de moléculas mediadoras puede lograr el efecto ventajoso de mantener el receptor de GP1b apartado de la superficie, con lo cual dicho receptor puede enlazar de una manera más simple el VWF.

Además, la presente invención hace referencia a la utilización de los fragmentos de trombocitos aglutinables elaborados conforme a la presente invención, en un método para la determinación de la actividad del VWF de una muestra.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para la determinación de la actividad del VWF de una muestra, en donde la muestra se mezcla con los fragmentos de trombocitos aglutinables elaborados conforme a la presente invención, y se determina la reacción de aglutinación de los fragmentos de trombocitos en la mezcla de reacción. Para dicho procedimiento, la muestra, preferentemente una muestra de plasma, se mezcla con los fragmentos de trombocitos que se suspenden preferentemente en una solución tampón, para obtener una mezcla de reacción. Para la determinación de la actividad del VWF que depende de la ristocetina, a la mezcla de reacción se puede adicionar además ristocetina.

En una forma de ejecución particularmente preferida de un método conforme a la presente invención, para la determinación de la actividad del VWF de una muestra, a los fragmentos de trombocitos se adiciona, justo antes de que se mezclen con la muestra, cloruro de sodio, preferentemente en forma de una solución de NaCl. Preferentemente, la concentración de NaCl en la suspensión de fragmentos de trombocitos, después de la adición de NaCl, asciende a 5 g/L, de manera particularmente preferente a 3 g/L.

En otra forma de ejecución ventajosa de un método conforme a la presente invención, para la determinación de la actividad del VWF, la mezcla de reacción no se mezcla de manera continua. De manera sorprendente, no resulta necesario un mezclado continuo de la mezcla de reacción durante el registro de los valores de medición, como por ejemplo, mediante agitación o sacudimiento de la mezcla de prueba, dado que sin realizar un mezclado continuo de la mezcla de reacción, también se logra una reacción de aglutinación que permite una cuantificación de la actividad del VWF.

Preferentemente, la reacción de aglutinación de los fragmentos de trombocitos en la mezcla de reacción, se mide mediante la medición de una propiedad óptica de la mezcla de reacción, que varía en relación con la reacción de aglutinación. De manera particularmente preferente, se mide la reducción de la transmisión o el incremento de la dispersión de luz.

Figuras

Fig. 1 El incremento lineal de la curva de referencia muestra: La reacción de aglutinación de los fragmentos de trombocitos conformes a la presente invención, se comporta de manera proporcional en relación con la actividad del VWF en el plasma bovino.

Fig. 2 La correlación de los resultados de la prueba (actividad del VWF) que han sido determinados mediante una prueba convencional de trombocitos, y mediante la nueva prueba de fragmentos de trombocitos para las mismas muestras de plasma bovino. El coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9879$ confirma la relación lineal entre los resultados de ambas pruebas.

Ejemplos de ejecución

Ejemplo 1: Elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinables

Para la obtención de trombocitos nativos, se ha centrifugado un concentrado de aféresis de trombocitos de sangre total humana, en una pluralidad de tubos de ensayo en una centrífuga previamente enfriada, durante 10 minutos con

5 1500 g sin frenar, a 4°C. Los sobrenadantes han sido retirados, y los sedimentos se han asociado en respectivamente 30 mL de solución tampón de citrato (9,07 g/L de di-sodio hidrogenofosfato, 1,65 g/L de dihidrógeno fosfato de potasio, 0,38 % de citrato de sodio, 1,2 g/L de NaCl). La resuspensión y la homogeneización realizadas con la ayuda de un dispositivo de dispersión Ultra Turrax (Janke y Kunkel GmbH, Staufen, Alemania) (10 segundos a 13500 rpm). A continuación, se ha ajustado el número de trombocitos mediante la dilución con la sustancia tampón de citrato, en 1.000.000 de trombocitos/mL.

10 La suspensión de trombocitos se ha incubado durante 30 minutos en el baño de hielo. A continuación, se han tratado alícuotas de 20 mL con la sonda de ultrasonido Branson Sonifier 250 (Branson, Danbury, Estados Unidos) con un enfriamiento permanente sobre hielo durante 15 segundos, de la siguiente manera: Ciclo de trabajo: 100 %, control de rendimiento: 7. Directamente a continuación se ha adicionado formaldehído, de manera que la concentración final de formaldehído ha ascendido al 1 %. Después de una fijación de un día para otro (alrededor de 14 horas) a 2-8 °C, se ha realizado un proceso de diálisis con la solución tampón (9,07 g/L de di-sodio hidrogenofosfato, 1,65 g/L de dihidrógeno fosfato de potasio, 1,2 g/L de NaCl), hasta que el contenido de formaldehído se ha reducido a una concentración menor a 0,001 %.

15 Para el enriquecimiento de fracciones particularmente ventajosas, se ha homogeneizado la suspensión de fragmentos con la ayuda del dispositivo de dispersión Ultra Turrax, y se ha centrifugado en alícuotas de 20 mL durante 10 minutos con 1500 g a 20°C. Los sobrenadantes se han retirado, y se han centrifugado durante 40 minutos con 4000 g a 20 °C. Los sedimentos se han asociado en respectivamente 1 mL de solución tampón de fosfato (0,907 g/L de di-sodio hidrogenofosfato, 0,165 g/L de dihidrógeno fosfato de potasio), y se han procesado con el agitador hasta que el sedimento se ha separado completamente del fondo. Una pluralidad de sedimentos de esta clase resuspendidos se han combinado en un tubo plástico de 14 mL, y se han homogeneizado con la ayuda del dispositivo de dispersión Ultra Turrax, durante 5 a 10 segundos a 13500 rpm.

Directamente antes de la aplicación de la suspensión de fragmentos para la determinación de la actividad del VWF, se ha adicionado NaCl de manera que la concentración de NaCl en la suspensión ha ascendido a 2 g/L.

25 **Ejemplo 2: Determinación de la actividad del VWF en el plasma bovino, mediante la utilización de los fragmentos de trombocitos elaborados conforme a la presente invención.**

Las siguientes etapas se han realizado de manera automática en el dispositivo de medición de coagulación BCT® (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania):

30 Se ha mezclado 50 mL de plasma de citrato bovino pobre en plaquetas, con 100 mL de una suspensión de fragmentos de trombocitos elaborada como en el ejemplo 1, para obtener una mezcla de reacción, y se ha incubado durante 15 segundos a 37 °C.

35 La extinción de la mezcla de reacción a 620 nm, se ha medido en un periodo de tiempo de 90 segundos, sin que la mezcla de reacción se haya mezclado durante la medición. Mediante la cinética de la reacción de agregación determinada de esta manera, se ha determinado la variación de la extinción (mU/minuto), y se ha determinado la variación máxima de la extinción (incremento de Vmax de extinción).

40 Para crear una curva de calibración, se ha diluido en una serie de dilución, plasma bovino normal (actividad del VWF = 100 %) con plasma deficiente de VWF. El plasma normal sin diluir, así como las diferentes diluciones que han presentado diferentes actividades del VWF, se han analizado con el método descrito. La figura 1 muestra la curva de referencia creada de esta manera. La reacción de aglutinación de los fragmentos de trombocitos conformes a la presente invención, se comporta de manera proporcional en relación con la actividad del VWF de una muestra.

45 En un experimento comparativo, se han realizado pruebas de las mismas diluciones de plasma bovino, mediante una prueba de aglutinación convencional, en la que se han mezclado trombocitos completamente fijados, con la muestra. Como se deduce a partir de la figura 2, los resultados del nuevo método de prueba, en el que se utilizan los fragmentos de trombocitos elaborados conforme a la presente invención, se correlacionan de manera óptima con los resultados de la prueba convencional.

REIVINDICACIONES

1. Método para la elaboración de fragmentos de trombocitos aglutinables, **caracterizado porque** en primer lugar se tratan trombocitos nativos con ultrasonido, y se fijan a continuación.
- 5 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** los trombocitos se tratan con ultrasonido en presencia de un anticoagulante, y se fijan.
3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** los trombocitos se tratan con ultrasonido en ausencia de inhibidores de la función de los trombocitos, y se fijan.
- 10 4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** después del tratamiento con ultrasonido, los trombocitos se fijan con agentes fijadores del grupo de formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído.
5. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** después de la fijación se combina proteína del receptor GP1b con los fragmentos de trombocitos.
6. Utilización de fragmentos de trombocitos aglutinables que se pueden obtener de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en un método para la determinación de la actividad del VWF de una muestra.
- 15 7. Método para la determinación de la actividad del VWF de una muestra, **caracterizado porque** la muestra se mezcla con fragmentos de trombocitos aglutinables que se pueden obtener de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, y se determina la reacción de aglutinación de los fragmentos de trombocitos en la mezcla de reacción.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** a la mezcla de reacción se adiciona ristocetina.
- 20 9. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado porque** los fragmentos de trombocitos se utilizan en forma de una suspensión, que contiene cloruro de sodio en una concentración menor a 5 g/L, preferentemente menor a 3 g/L.
10. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado porque** la mezcla de reacción no se mezcla de manera continua.
- 25 11. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizado porque** la reacción de aglutinación de los fragmentos de trombocitos en la mezcla de reacción, se determina mediante la medición de la reducción de la transmisión.

Fig.1

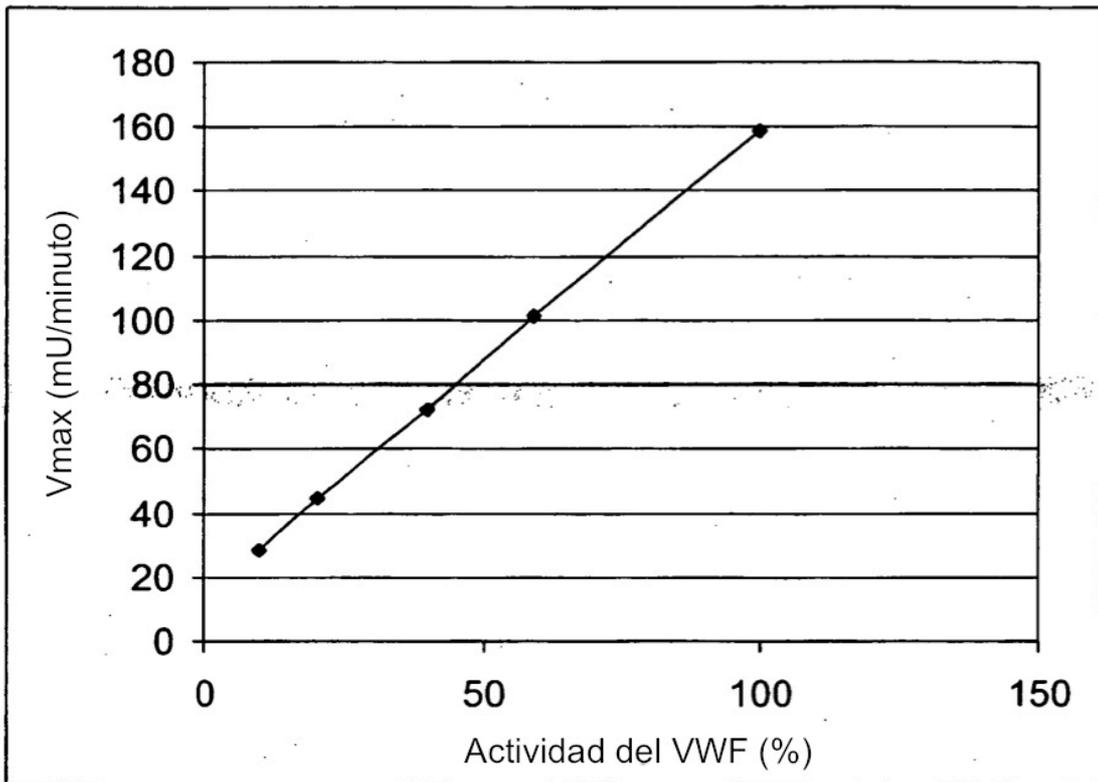


Fig. 2

