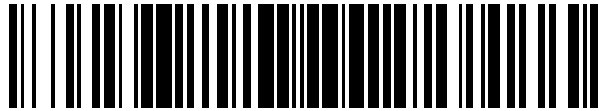


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 995**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2006 E 06706670 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1851552**

54 Título: **Método para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno utilizando técnicas tromboelastográficas**

30 Prioridad:

08.02.2005 DE 102005005824

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

18.07.2014

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**WRABETZ, ERHARDT;
METZNER, HUBERT y
KORTE, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 477 995 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 diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno utilizando técnicas tromboelastográficas

- 5
- 1 Introducción
- La invención se refiere a un método para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, mediante determinación simultánea de los dos estados deficitarios potenciales a partir de una muestra, así como a su comparación, por una parte
- 10
- mediante comparación de determinados parámetros TEG en presencia, con determinados parámetros TEG en ausencia de inhibidores de factor XIII
 - 15 o
 - mediante comparación de determinados parámetros TEG en el caso de adición con los de sin adición de factor XIII, así como, por otra parte,
 - 20 - mediante comparación de determinados parámetros TEG en presencia de activadores de fibrinógeno con determinados parámetros TEG en presencia de activadores de fibrinógeno en sangre o plasmas normales.

2 Presentación del estado conocido de la técnica

25

La tromboelastografía (TEG) es un método de diagnóstico que examina de forma mecánica la formación o la disolución de coágulos en un sistema oscilante. En este caso, un recipiente (taza) se mueve de manera oscilante alrededor de una varilla de medición (Pin) (TEG convencional), o bien el recipiente está fijo y el Pin se pone en movimientos de rotación oscilantes (ROTEG o bien ROTEM). Se registran las fuerzas mecánicas que se manifiestan entre la copa y el Pin. Tan pronto como la sangre o el plasma pase a la coagulación, se produce una desviación de la señal de medición inicial. Ambas versiones se denominan en este documento TEG.

30

El TEG se utiliza para las pruebas de sangre o de plasma para determinar los parámetros relevantes para la coagulación (parámetros TEG) tales como el tiempo hasta alcanzar una primera formación de coágulos significativa con una amplitud de 2 mm (tiempo de coagulación o reacción r), espacio de tiempo hasta alcanzar una potencia del coágulo de una amplitud de 20 mm (valor k), la velocidad a la que se forma el coágulo (ángulo alfa), las propiedades mecánicas del coágulo en el caso de una amplitud máxima (MA – siglas en alemán) o en cualquier otro momento deseado, el espacio de tiempo requerido hasta la MA (TMA), o el espacio de tiempo hasta que la firmeza del coágulo, debido a la fibrinólisis, haya caído de nuevo a un determinado valor. Clínicamente, el TEG se utiliza, entre otros, para evaluar la coagulopatía, por ejemplo en la cirugía cardiaca, en trasplantes de hígado, cirugía abdominal mayor y como una prueba de noche casi en la gestión peri-operatoria de la coagulación como medida de diagnóstico (Kettner SC et al. 1999), Anesth Analg; 89: 580-584; Shore Lesserson L et al. 1999), Anesth Analg; 88: 312-319 et al., Harding SA et al. (1997), Br J Anaesth; 78: 175-179; Kettner SC, et al. (1998) Anesth Analg; 86: 691-695, Pivalizza EG et al. (1998), J Cardiothorac Vasc Anesth; 12: 305-308, Mahla E et al. (2001), Anest Analg; 92: 572-577; Calatzis AN et al. (1996), Eur Surg Res; 28: S1 (89), Mahla E et al. (2001), Anesth Analg; 92 (3): 572-577). El TEG se encuentra a disposición, de forma complementaria, para el diagnóstico de coagulación estándar (entre otros, Quick, aPTT, número de trombocitos, AT III, fibrinógeno, dímeros D, tiempo de sangría), que requiere mucho tiempo para la determinación de los valores, para una rápida orientación sobre las tendencias de sangría. Esto es especialmente importante si se manifiestan coagulopatías en el marco de intervenciones quirúrgicas extensivas o después de politraumatismo, ya que los trastornos de hemostasia graves pueden conducir rápidamente al desarrollo de lesiones tisulares secundarias y, a menudo, son resistentes frente a una terapia hemostática convencional sobre la base de un diagnóstico de coagulación estándar que requiere mucho tiempo.

35

40

45

50

Los parámetros TEG mencionados se ven afectados por una serie de factores que se denominarán en lo que sigue factores con relevancia tromboelastográfica. Factores con relevancia tromboelastográfica son, ante todo, los niveles de fibrinógeno, factor XIII y de plaquetas, así como componentes del sistema fibrinolítico tales como plasmina, activadores de plasmina e inhibidores de plasmina. Así, por ejemplo, el fibrinógeno se correlaciona como sustrato de la coagulación con la estabilidad del coágulo. Esto se puede demostrar de manera inequívoca en el tromboelastograma. Además de ello, el factor XIII modula asimismo, a través de la reticulación de la fibrina formada a partir del fibrinógeno, las propiedades mecánicas del coágulo y limita su lisis (P. Lauer et al. (2002), Thromb Haemost; 88:967-974). Ambos efectos no son hasta ahora inequívocamente separables en la tromboelastografía, ya que afectan por igual a las métricas claves de un tromboelastograma. Tanto el fibrinógeno como el factor XIII influyen

55

60

- de forma significativa sobre los parámetros tiempo de coagulación (r), firmeza máxima del coágulo, ángulo alfa como medida de la velocidad de la formación del coágulo y el tiempo de lisis del coágulo significativa (Nielsen VG et al. (2004), *Anesth Analg*; 99: 120-123). Dado que no necesariamente caen por igual el nivel de fibrinógeno y de factor XIII en estados deficitarios adquiridos tales como politraumatismo o cirugía mayor, no es hasta ahora posible una intervención terapéutica preestablecida de forma inequívoca a favor de uno u otro componente sobre la base de del trombelastograma. Por tanto, sería deseable disponer de un método que permitiera, en base al diagnóstico rápido de TEG, poder afirmar si una tendencia a la sangría se basa en una deficiencia de factor XIII y/o en una deficiencia de fibrinógeno.
- 5
- 10 El documento WO2004/092742 describe un procedimiento para la medición de una deficiencia de trombina. En este caso se añade a las muestras heparina en calidad de anticoagulante indirecto de antitrombina.
- El documento WO0107070 da a conocer un procedimiento para la medición de la actividad de factores de coagulación, añadiéndose a las muestra inhibidores frente a diversos factores de coagulación y midiéndose el tiempo de coagulación. El método sirve descubrir estados hipercoagulativos.
- 15
- El documento WO2004081579 da a conocer el uso de la tromboelastografía para vigilar diferentes parámetros tromboelastográficos en la inhibición de plaquetas.
- 20 El documento US 6.245.573 se ocupa de la influencia de iones de metales sobre la viscosidad y la actividad de coagulación de la sangre.
- Craft et al. (*American Society of Anesthesiologists*, Filadelfia, PA, EE.UU nº 2003, 15 de octubre de 2003 , Resumen Nº 148),
- 25
- Katori et al. (*Anesthesia and Analgesia*, tomo 99, Nº 6 (2004) describe una tromboelastografía modificada mediante batroxobina para la detección de una inhibición de las plaquetas inducida por eptifibatida.
- Nielsen et al. (*Acta Aneasthesiologica Scandinavia*, tomo 49, Nº 2, páginas 222-231 (2005) se ocupa del papel del fibrinógeno en el caso de las mediciones tromboelastográficas. Se muestra una clara dependencia de la tromboelastografía de la concentración de fibrinógeno.
- 30
- Estner (Disertación presentada el 23.4.2001 en la Universidad Técnica de München) investiga el papel de factor XIII en la formación del coágulo y la firmeza del coágulo antes y después de intervenciones quirúrgicas del corazón con ayuda de la tromboelastografía.
- 35
- Wilmer et al. (*Hämatoserologie* 1, (2002)) describe el uso de diversos métodos, entre ellos también el de la tromboelastografía para la determinación de la formación del coágulo y de la calidad del coágulo.
- 40 Tyler et al. (1969) examina la influencia de la reticulación de fibrina sobre parámetros tromboelastográficos.

3 Presentación del problema y su solución

45 Las presentes investigaciones tuvieron por misión posibilitar, por medio de técnicas tromboelastográficas, una diferenciación inequívoca de las magnitudes de influencia factor XIII y fibrinógeno en el caso de trastornos de hemostasis y evaluar su respectiva proporción en el trastorno de la hemostasis, para permitir con ello una intervención terapéutica preestablecida por sustitución del factor que falta.

50 El problema se resolvió debido a que se desarrolló un procedimiento que sirve para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, mediante la determinación simultánea de los dos estados deficitarios potenciales a partir de una muestra, así como su comparación.

55 En particular, el contenido de los factores tromboelastográficos factor XIII y fibrinógeno puede ser diferenciado, debido a que la medición se lleva a cabo con y sin inhibidores de factor XIII y/o con y sin la adición de factor XIII y/o por la adición de activadores de fibrinógeno. Mediante la comparación de los parámetros TEG de estos enfoques, se puede determinar la influencia de los factores individuales y el grado de sustitución necesaria de los componentes individuales para alcanzar una hemostasia estable. Con ello se pueden someter a terapia de forma todavía más preestablecida y rápida, por ejemplo, hemorragias masivas intraoperatorias y se pueden reconocer riesgos de trastornos de hemostasis postoperatorios y, eventualmente, trastornos en la cicatrización condicionados por los anteriores y asimismo se pueden evitar de manera preestablecida por la sustitución de los componentes individuales. Otros componentes que afectan a los parámetros TEG tales como número y actividad de los trombocitos o la actividad fibrinolítica se pueden suprimir por procedimientos conocidos.

60

4 Descripción detallada de la invención y diversas formas de realización

5 Mediante comparación de los parámetros TEG tales como, por ejemplo, el tiempo de reacción (r), la amplitud máxima (MA), el tiempo hasta alcanzar la máxima amplitud (TMA) o el ángulo alfa en presencia o ausencia de inhibidores de factor XIII se puede diferenciar entre una deficiencia de factor XIII y otros estados deficitarios como la causa de trastornos de la hemostasis.

10 Para la inhibición del factor XIII pueden utilizarse, por ejemplo, anticuerpos contra el factor XIII, inhibidores peptídicos tal como Tridegin (Finney S. et al. (1997), Biochem J. 324: 797-805) o inhibidores de bajo peso molecular del factor XIII tales como, por ejemplo, putrescina, dansilcadaverina o similares (Prasa D. et al. (2002), Hämostasologie 22:29-33). El inhibidor de factor XIII o bien la concentración del inhibidor del factor XIII se ha de seleccionar preferiblemente de manera que la actividad del factor XIII quede inhibida en la muestra examinada de manera específica y completa.

15 Cuanto menor sea el nivel de factor XIII en un paciente, tanto menor será en este caso la diferencia entre el valor de un parámetro TEG, el que se mide en presencia y el que se mide en ausencia de un inhibidor del factor XIII. La evaluación de la diferencia entre los parámetros TEG en presencia y ausencia de un inhibidor del factor XIII permite concluir si existe una deficiencia en factor XIII ligera, media o grave. Mediante la reposición de una muestra de sangre entera de un paciente con deficiencia en factor XIII y mediante la comparación del tromboelastograma en presencia y ausencia de un inhibidor de factor XIII en estas muestras, el efecto se puede representar también en forma de una curva patrón. Una curva obtenida de esta manera permite determinar el nivel de factor XIII en una muestra de un paciente a partir de la diferencia entre un parámetro TEG en presencia y ausencia de un inhibidor del factor XIII. Preferiblemente se establecen correspondientes curvas patrón a diferentes contenidos de fibrinógeno.

25 Con respecto a la diferencia de la muestra del paciente en presencia y ausencia de un inhibidor del factor XIII en la relación del parámetro TEG (con adición de inhibidor) del plasma del paciente a una muestra control resulta también la posibilidad de relativizar la diferencia de la medición y, con ello, tener en cuenta diferentes niveles de fibrinógeno, p. ej., mediante la formación del siguiente término en el caso de la amplitud máxima: $(MA_{\text{muestra sin inh.}} - MA_{\text{muestra con inh.}}) / (MA_{\text{control con inh.}} - MA_{\text{muestra con inh.}})$. Curvas patrón análogas también se pueden obtener con plasma pobre en plaquetas y plasma rico en plaquetas. Por debajo de un valor de 70% del valor normal de factor XIII en el plasma se habla de estados deficitarios de factor XIII, que deben ser sometidos a terapia (T. Muto et al. (1997), Biomed. Progress 10: 16-19).

35 Una deficiencia en factor XIII se puede detectar también, alternativamente, mediante un modo de proceder inverso, comparando en el TEG una muestra con y sin la adición de factor XIII. Una pequeña diferencia en los parámetros TEG apunta en este caso, a la inversa del uso de inhibidores de factor XIII, a un valor normal del factor XIII en la muestra, mientras que grandes diferencias apuntan a una grave deficiencia en factor XIII. Como se describió anteriormente, sobre la base de sangre entera o bien plasma deficiente en factor XIII, también se pueden establecer curvas patrón para este modo de proceder que permiten un diagnóstico más preciso. En el caso de la adición de factor XIII se añade al menos una cantidad que ajustaría 100% de factor XIII, también en el caso de una deficiencia total en factor XIII. Preferiblemente, se emplea incluso cantidades aún mayores de F XIII, en comparación con las cuales es desdeñable el F XIII contenido en la muestra.

45 Con el fin de mejorar un diagnóstico diferencial frente al nivel de fibrinógeno que influye asimismo fuertemente sobre los parámetros TEG, otro aspecto de la presente invención es la determinación del nivel de fibrinógeno en sangre del paciente con ayuda de parámetros tromboelastográficos.

50 Un método para evaluar una posible deficiencia de fibrinógeno consiste en el tratamiento de una muestra de sangre entera o bien de un plasma pobre en plaquetas o rico en plaquetas con proteasas, que activan fibrinógeno, pero que no son reactivas frente a factor XIII. Así, por ejemplo mediante el uso de batroxobina, un proteasa aislada del veneno de serpiente, el fibrinógeno de la muestra se puede convertir en fibrina (sin reticulación por el factor XIII) y en comparación con un control normal (sangre o plasma de donantes sanos) se puede detectar una disminución de fibrinógeno. En este caso, puede ser ventajoso trabajar en presencia de hirudina, a fin de evitar una activación del factor XIII en el transcurso de la medición. Para llevar a cabo un ensayo TEG, la cantidad añadida de proteasas debería ser suficiente para activar el fibrinógeno en cuestión de unos pocos minutos y polimerizarlo bajo la formación de un coágulo. En el caso de batroxobina, el fibrinógeno debería reaccionar para formar des-AA-fibrinógeno que se polimeriza para formar un coágulo. Cuanto mayor sea la diferencia con el valor normal del parámetro TEG investigado, tanto mayor será la deficiencia en fibrinógeno en la muestra del paciente. La activación de fibrinógeno tiene lugar de manera ventajosa en presencia de factores que inhiben la activación de factor XIII tal como, por ejemplo, en presencia de inhibidores de trombina tal como, p. ej. hirudina.

Dado que los trombocitos pueden tener asimismo una influencia sobre las propiedades del coágulo y, con ello, sobre los parámetros TEG en la sangre entera, la realización preferida del diagnóstico diferencial con la exclusión simultánea de efectos de los trombocitos, es un aspecto adicional de esta invención. Por ejemplo, es posible el uso de plasma pobre en plaquetas, ya que la diferenciación de fibrinógeno y factor XIII es posible, en principio, tanto en sangre entera como en el plasma. En el caso del plasma debería utilizarse entonces, para iniciar la coagulación, reactivo de la superficie tal como el reactivo aPTT o un reactivo del factor tisular. Alternativamente, en el caso de utilizar plasma rico en plaquetas o sangre entera, la determinación de los parámetros TEG se puede llevar a cabo en presencia de antagonistas de plaquetas tales como, por ejemplo, citocalasina y/o abciximab, bajo la exclusión de los efectos de trombocitos. Una forma de realización particularmente preferida es la eliminación de los efectos de plaquetas por una combinación de citocalasina D y abciximab (Lang et al., J Thromb Haemost. 2004; 2 (1): 147-53).

Puesto que el sistema trombolítico también puede tener un efecto sobre las propiedades del coágulo y, con ello, sobre los parámetros TEG, para excluir influencias del sistema trombolítico es ventajosa la inhibición de los componentes del sistema trombolítico. Otro aspecto de esta invención es, por lo tanto, la realización del diagnóstico diferencial descrito con una inhibición simultánea de actividades trombolíticas tales como, p. ej., de plasmina o activadores de plasmina o bien con la activación simultánea de inhibidores de plasmina. Una forma de realización preferida es en este caso la realización del TEG en presencia de aprotinina, α 2-antiplasmina u otros inhibidores similares o también inhibidores de bajo peso molecular.

Una forma de realización particularmente preferida es la realización del TEG con la exclusión simultánea de la influencia de las plaquetas, así como la eliminación del sistema trombolítico.

Los procedimientos descritos hacen posible eliminar en el sistema tromboelastográfico el efecto de las plaquetas y del sistema trombolítico y llevar a cabo una diferenciación entre una deficiencia en factor XIII y una deficiencia en fibrinógeno. La ventaja particular estriba en este caso en que, próximo en el tiempo y para el paciente, se puede determinar por medio de TEG el nivel de factor XIII y el nivel de fibrinógeno y, por consiguiente, el resultado del diagnóstico se puede implementar directamente en la terapia.

El uso de inhibidores de factor XIII también hace posible eliminar en estas mediciones al factor XIII como factor de influencia mediante TEG en presencia y ausencia de antagonistas de plaquetas o de inhibidores de la fibrinólisis y, por consiguiente, diagnosticar de una manera más inequívoca los efectos de las plaquetas.

Objeto de la invención es un método para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, mediante la determinación simultánea de los dos estados deficitarios potenciales a partir de una muestra, así como a su comparación, por una parte

- mediante comparación de determinados parámetros TEG en presencia, con determinados parámetros TEG en ausencia de inhibidores de factor XIII

- mediante comparación de determinados parámetros TEG en el caso de adición con los de sin adición de factor XIII, así como, por otra parte,

- mediante comparación de determinados parámetros TEG en presencia de activadores de fibrinógeno con determinados parámetros TEG en presencia de activadores de fibrinógeno en sangre o plasmas normales.

A través de las mediciones de múltiples canales, es posible obtener una afirmación más diferenciada de la necesidad de sustitución de factor XIII y/o fibrinógeno.

En una forma de realización de un kit de diagnóstico, los reactivos ya están dispuestos en las copas de TEG.

5. Ejemplos

1. Inhibición de factor XIII en plasma mediante la adición de anticuerpos de factor XIII

Para determinar cuantitativamente la influencia de factor XIII se analizó mediante TEG en un experimento plasma humano estándar sin o bien con la adición de inhibidores de factor XIII (preparación de IgG anti-factor XIII). La reacción de coagulación fue acelerada mediante la adición de un reactivo de aPTT. La tanda de ensayo contenía: disolución de NaCl o preparación de IgG anti-factor XIII en diferentes diluciones (30 μ L), Pathromtin SL (50 μ L, Dade Behring), plasma humano estándar (200 μ L) y disolución de CaCl_2 200 mM (20 μ L). A 37 °C se pipetearon los reactivos en la copa y se inició la medición TEG en aparatos de la razón social Haemoscope. Se evaluaron los

siguientes parámetros de medición: R, ángulo alfa, amplitud máxima y tiempo hasta alcanzar la máxima amplitud.

Tabla 1: Inhibición de factor XIII en plasma mediante adición de anticuerpos de factor XIII

	R (s)	Ángulo (°)	MA (mm)	TMA (s)	Valores medios de n=8
Control (sin AC de F XIII)	133,8	70,7	16,7	721,3	
Prep. de IgG anti-F XIII 1:3	217,5	53,3	7,1	272,5	n=2
1:10	157,5	61,7	9,9	382,5	n=2
1:30	152,5	67,5	15,1	605,0	n=2
1:100	120,0	69,2	16,3	681,5	n=2

5 Los resultados demuestran que la inhibición de factor XIII repercute claramente sobre los parámetros TEG medidos. De manera correspondiente, un enfoque comparativo (+/- inhibidor de factor XIII) permitiría, en el caso de una muestra de un paciente con una amplitud máxima reducida, estimar si todavía está presente una cantidad suficiente de factor XIII en la muestra, o si ésta está reducida de manera significativa (en el caso de un nivel de factor XIII reducido, el efecto de la adición de inhibidor de factor XIII resultaría menor que en el caso de un nivel normal de factor XIII).

10 **2. Ensayo de plasmas y sangre entera por medio de mediciones paralelas en presencia y ausencia de inhibidores de factor XIII de bajo peso molecular (Ejemplo hipotético)**

15 Para la determinación cuantitativa de la influencia de factor XIII se analizó mediante TEG plasma humano estándar sin o bien con la adición de inhibidores de factor XIII de bajo peso molecular. La reacción de coagulación se inició o bien aceleró mediante la adición de un reactivo de factor tisular. La tanda de ensayo contenía: 200 µL de plasma, 30 µL de disolución de NaCl (control) o disolución de inhibidor en diferentes diluciones, 50 µL de reactivo de factor tisular (Thromborel S, Dade Behring) y 20 µL de disolución de cloruro de calcio (200 mmol/L). A 37 °C los reactivos se pipetearon en la copa y se inició la medición TEG en aparatos de la razón social Haemoscope. Alternativamente, el cloruro de calcio se puede añadir ya también al reactivo de factor tisular y, con ello, se puede iniciar la reacción.

20 Se determinaron y evaluaron los parámetros de medición tiempo de reacción (R), ángulo alfa, amplitud máxima (MA) y tiempo hasta alcanzar la máxima amplitud (TMA).

25 Como inhibidores de F XIII para la diferenciación del contenido en F XIII se emplearon putrescina, histidina, dansilcadaverina o bien cloruro de 1,3,4,5-tetrametil-2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio en diferentes diluciones. Los ensayos llevados a cabo aquí con plasma se pueden trasladar, en principio, también a sangre entera.

Tabla 2: Efecto de putrescina, monodansilcadaverina e histamina sobre los parámetros TEG en el caso de utilizar plasma humano estándar

Putrescina	R:	Ángulo:	MA:	TMA:
Concentración en el ensayo (µg/mL)	s	°	mm	s
1,07	22,5	73,1	77,2	452,5
3,21	17,5	73,7	15,9	277,5
10,7	20,0	73,4	18,7	672,5
32,1	25	73,0	16,9	585,0
107	15	73,0	16,5	505,0
321	20	72,8	15,8	400,0
1.071	25	69,5	13,6	405,0
3.214	32,5	72,6	13,9	327,5
Monodansilcadaverina				
Concentración en el ensayo (µg/mL)	s	°	mm	s
0,32	20,0	74,0	18,1	655,0

1,07	22,5	74,9	18,4	610,0
3,21	20,0	74,7	19,1	657,5
10,7	25,0	74,4	18,4	560,0
32,1	17,5	74,4	17,3	562,5
107	32,5	76,9	18,7	237,5
321	20,0	71,0	15,1	490,0
536	27,5	70,3	13,3	370,0
Histamina				
Concentración en el ensayo (µg/mL)	R:	Ángulo:	MA:	TMA:
1,07	s	°	mm	s
3,21	20,0	73,4	17,8	592,5
10,7	22,5	75,0	17,9	527,5
32,1	20,0	74,8	19,2	622,5
107	22,0	73,9	17,2	472,5
321	17,5	73,5	16,9	462,5
1.071	20,0	72,7	15,5	430,0
3.214	15,0	70,3	14,0	492,5
Control				
(Disolución fisiológica de NaCl)	R:	Ángulo:	MA:	TMA:
	s	°	mm	s
	25,6	75,6	19,7	572

Tabla 3: Efecto de cloruro de 1,3,4,5-tetrametil-2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio sobre los parámetros TEG

Cloruro de 1,3,4,5-tetrametil-2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio	R:	Ángulo:	MA:	TMA:
Concentración en el ensayo (µg/mL)	s	°	mm	s
0,033	22,5	79,6	21,5	177,5
0,10	22,5	79,0	18,5	140,0
0,33	22,5	77,0	14,9	77,5
1,00	22,5	75,4	13,1	77,5
3,33	22,5	74,0	12,4	77,5
Control				
(Disolución fisiológica de NaCl)				
	27,5	77,7	21,6	520,0

5 Se demuestra que los inhibidores investigados pueden inhibir el efecto de F XIII, y los parámetros TEG relevantes tal como, p. ej., la amplitud máxima (MA), puede responder de manera significativa al contenido en F XIII todavía disponible. De esta manera se pueden identificar plasmas deficientes en F XIII, dado que este tipo de plasmas no muestran o sólo lo hacen de forma limitada el efecto de los inhibidores de F XIII. A partir de las investigaciones anteriores, como concentraciones preferidas de inhibidores resultan aquellas en las que los parámetros afectados por el F XIII tal como la amplitud máxima (MA) ya no caen ni aumentan claramente. Para el cloruro de 1,3,4,5-tetrametil-2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio ésta es, p. ej., una concentración final de 1 µg/mL, de manera particularmente preferida de aprox. 3 µg/mL o mayor.

15 **3. Ensayo diferencial para el diagnóstico de una deficiencia en fibrinógeno y factor XIII (Ejemplo hipotético)**

Analítica TEG diferencial para la estimación de la capacidad residual de factor XIII y fibrinógeno o bien otros factores, relevante para la coagulación. Se puede investigar toda la gama de condiciones o escoger de manera correspondiente a la problemática respectiva.

20 Tanda experimental:

- a) muestra no modificada,
- b) muestra en presencia de anticuerpos de factor XIII
- c) muestra hecha coagular mediante batroxobina (p. ej., en presencia de hirudina)
- 25 d) muestra en presencia de antagonistas de trombocitos (en el caso de sangre entera o plasma rico en plaquetas)
- e) muestra en presencia de aprotinina

- f) muestra en presencia de aprotinina y antagonistas de trombocitos (en el caso de sangre entera o plasma rico en plaquetas)
- g) muestras en presencia de inhibidor de F XIII, antagonistas de trombocitos e inhibidor de la fibrinólisis (en el caso de sangre entera o plasma rico en plaquetas)

5 Tiene lugar una comparación frente a mediciones TEG históricas con sangre normal o plasma normal en presencia o bien ausencia de los aditivos correspondientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, mediante determinación simultánea de los dos estados deficitarios potenciales a partir de una muestra, así como su comparación, por una parte
- mediante comparación de determinados parámetros TEG en presencia, con determinados parámetros TEG en ausencia de inhibidores de factor XIII
 - 10 o
 - mediante comparación de determinados parámetros TEG en el caso de adición con los de sin adición de factor XIII, así como, por otra parte,
 - 15 - mediante comparación de determinados parámetros TEG en presencia de activadores de fibrinógeno con determinados parámetros TEG en presencia de activadores de fibrinógeno en sangre o plasmas normales.
2. Método según la reivindicación 1, en el que tiene lugar una determinación de estados deficitarios de factor XIII mediante medición, evaluación y comparación de determinados parámetros TEG en presencia y ausencia de inhibidores de factor XIII.
- 20 3. Método según la reivindicación 1, en el que tiene lugar una determinación de estados deficitarios de factor XIII mediante medición, evaluación y comparación de determinados parámetros TEG en el caso de adición de factor XIII y sin adición de factor XIII.
- 25 4. Método según la reivindicación 1, en el que tiene lugar una determinación de estados deficitarios de fibrinógeno mediante comparación de parámetros tromboelastográficos en presencia de activadores de fibrinógeno con valores normales de TEG, obtenidos mediante el uso de activadores de fibrinógeno en sangre o plasmas normales, siendo los activadores de fibrinógeno proteasas que activan el fibrinógeno, pero que no son reactivas frente al factor XIII.
- 30 5. Método según la reivindicación 1, para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, bajo la exclusión de la influencia de plaquetas sanguíneas mediante la determinación de los parámetros TEG en el caso de utilizar plasma pobre en plaquetas o mediante el empleo de antagonistas de plaquetas en el caso de utilizar sangre entera o plasma rico en plaquetas.
- 35 6. Método según la reivindicación 1, para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, bajo la exclusión de la influencia del sistema trombolítico mediante la determinación de los parámetros TEG en el caso de utilizar inhibidores del sistema trombolítico.
- 40 7. Método según la reivindicación 1, para la diferenciación de estados deficitarios de factor XIII frente a estados deficitarios de fibrinógeno, en el caso de utilizar plasma pobre en plaquetas o mediante el empleo de antagonistas de plaquetas en el caso de utilizar sangre entera o plasma rico en plaquetas, así como inhibición simultánea del sistema trombolítico según las reivindicaciones 5 y 6.
- 45 8. Uso de un método según las reivindicaciones 1 a 7, como base para tomar una decisión sobre una sustitución preestablecida de factor XIII y/o fibrinógeno.
9. Método correspondiente a las reivindicaciones 1, 2 así como 5 a 7, en el que como inhibidores del factor XIII se emplean anticuerpos policlonales o monoclonales.
- 50 10. Método correspondiente a las reivindicaciones 1, 2 así como 5 a 7, en el que como inhibidores del factor XIII se emplean inhibidores peptídicos.
- 55 11. Método correspondiente a las reivindicaciones 1, 2 así como 5 a 7, en el que como inhibidores del factor XIII se emplean inhibidores de bajo peso molecular.
12. Método correspondiente a las reivindicaciones 1, así como 5 a 8, en el que como activadores de fibrinógeno se emplean proteasas que no son activas frente al factor XIII.
- 60 13. Método correspondiente a las reivindicaciones 1, así como 5 a 8, en el que como activador de fibrinógeno se emplea batroxobina.
14. Método según las reivindicaciones 6 a 7, en el que como inhibidor del sistema trombolítico se emplea aprotinina.