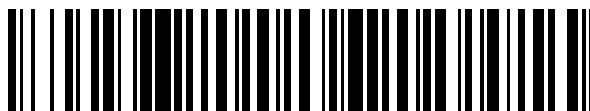


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 562**

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 12160723 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2474830**

54 Título: **Método para la determinación de estados deficitarios de factor XIII utilizando técnicas tromboelastográficas**

30 Prioridad:

08.02.2005 DE 102005005824

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

26.12.2014

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 2 525 562 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 determinación de estados deficitarios de factor XIII utilizando técnicas tromboelastográficas

5 1. Introducción

La invención se refiere a un método para la determinación de estados deficitarios de factor XIII mediante medición, evaluación y comparación de uno o varios de los parámetros TEG tiempo de reacción (r), amplitud máxima (MA), tiempo hasta alcanzar la amplitud máxima (TMA) y ángulo alfa en presencia y ausencia de inhibidores de factor XIII.

2. Presentación del estado conocido de la técnica

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.

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 cardíaca, 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), *Anesth 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.

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 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 tromboelastograma. 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.

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.

5 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.

El documento WO2004081579 da a conocer el uso de la tromboelastografía para vigilar diferentes parámetros tromboelastográficos en la inhibición de plaquetas.

10 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.

15 Craft et al. (American Society of Anesthesiologists, Filadelfia, PA, EE.UU nº 2003, 15 de octubre de 2003 , Resumen Nº 148),

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.

20 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.

25 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.

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.

30 Tyler et al. (1969) examina la influencia de la reticulación de fibrina sobre parámetros tromboelastográficos.

3. Presentación del problema y su solución

35 Las presentes investigaciones tuvieron por misión posibilitar, por medio de técnicas tromboelastográficas, una determinación del contenido de factor XIII, para permitir con ello una intervención terapéutica preestablecida por sustitución del factor que falta.

40 El problema se resolvió se desarrollándose un procedimiento para determinar estados deficitarios de factor XIII mediante medición, evaluación y comparación de uno o varios de los parámetros TEG tiempo de reacción (r), amplitud máxima (MA), tiempo hasta alcanzar la amplitud máxima (TMA) y ángulo alfa en presencia y ausencia de inhibidores de factor XIII.

4. Descripción detallada de la invención y diversas formas de realización

45 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.

50 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, dansilcaverina o similares (Prasa D. et al. (2002), Hämostaseologie 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
55 manera específica y completa.

60 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.

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).

Objeto de la invención es, por lo tanto, un método para determinar estados deficitarios de factor XIII mediante medición, evaluación y comparación de uno o varios de los parámetros TEG tiempo de reacción (r), amplitud máxima (MA), tiempo hasta alcanzar la amplitud máxima (TMA) y ángulo alfa en presencia y ausencia de inhibidores de factor XIII.

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 µL), Pathromtin SL (50 µL, Dade Behring), plasma humano estándar (200 µL) y disolución de CaCl₂ 200 mM (20 µL). 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	
Control (sin AC de F XIII)	133,8	70,7	16,7	721,3	n=8	
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	687,5	n=2

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).

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)

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 μ L de disolución de NaCl (control) o disolución de inhibidor en diferentes diluciones, 50 μ L de reactivo de factor tisular (Thromborel S, Dade Behring) y 20 μ L 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. 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).

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 (μ g/mL)	s	°	mm	s
1,07	22,5	73,1	17,2	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 (μ g/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 (μ g/mL)	s	°	mm	s
1,07	20,0	73,4	17,8	592,5
3,21	22,5	75,0	17,9	527,5
10,7	20,0	74,8	19,2	622,5
32,1	22,0	73,9	17,2	472,5
107	17,5	73,5	16,9	462,5
321	20,0	72,7	15,5	430,0
1.071	15,0	70,3	14,0	492,5
3.214	25,0	71,9	13,0	182,5
Control				
(Disolución fisiológica de NaCl)	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 (μ g/mL)	s	°	mm	s
0,033	22,5	79,6	21,5	177,5
0,10	22,5	79,0	18,5	140,0

ES 2 525 562 T3

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

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.

5

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método tromboelastográfico para determinar estados deficitarios de factor XIII mediante medición, evaluación y comparación de uno o varios de los parámetros TEG tiempo de reacción (r), amplitud máxima (MA), tiempo hasta alcanzar la amplitud máxima (TMA) y ángulo alfa en presencia y ausencia de inhibidores de factor XIII.
2. Método correspondiente a la reivindicación 1, en el que como inhibidores del factor XIII se emplean anticuerpos policlonales o monoclonales.
- 10 3. Método correspondiente a la reivindicación 1, en el que como inhibidores del factor XIII se emplean inhibidores peptídicos.
4. Método correspondiente a la reivindicaciones 1, en el que como inhibidores del factor XIII se emplean inhibidores de bajo peso molecular.