

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2008 PCT/EP2008/010899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2009 WO09080303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08865667 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2235542**

54 Título: **Método diagnóstico in vitro para evaluar la enfermedad de von Willebrand y un mayor riesgo hemorrágico asociado con la enfermedad de von Willebrand y los trastornos adquiridos o congénitos de la función trombocítica**

30 Prioridad:

21.12.2007 EP 07024932
10.10.2008 EP 08105554

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TOPF, HANS-GEORG y
RAUH, MANFRED

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 599 929 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 diagnóstico *in vitro* para evaluar la enfermedad de von Willebrand y un mayor riesgo hemorrágico asociado con la enfermedad de von Willebrand y los trastornos adquiridos o congénitos de la función trombocítica

5 La invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de von Willebrand (VWD, por sus siglas en inglés) y un mayor riesgo hemorrágico asociado con la enfermedad de von Willebrand y/o defectos adquiridos o congénitos en la función trombocítica que reducen la interacción del Factor de von Willebrand (VWF, por sus siglas en inglés) con los trombocitos. El método *in vitro* también se puede utilizar para diagnosticar riesgos hemorrágicos adicionales. La prueba es adecuada para su uso como una prueba de cribado con sangre entera y tiene el beneficio adicional de ser adecuada como una prueba de diagnóstico inmediato.

10 El VWF es una glucoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de los mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, el VWF actúa como un mediador entre receptores específicos sobre la superficie de los trombocitos y componentes de la matriz extracelular tales como el colágeno. Además, el VWF actúa como una proteína portadora y estabilizadora para el FVIII procoagulante. El VWF es sintetizado en las
15 células endoteliales y los megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, está constituido por un péptido señal de 22 residuos, un propéptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos que se observa en el VWF plasmático maduro (Fischer *et al.*, *FEBS Lett.* 351: 345-348, 1994). Tras la secreción en el plasma por parte de las células endoteliales y de los megacariocitos, el VWF circula en forma de diversas especies con diferentes tamaños moleculares. Estas moléculas del VWF están constituidas por oligo- y multímeros de la subunidad madura de 2050 residuos de aminoácido. El VWF se puede observar
20 normalmente en el plasma como un dímero y hasta multímeros constituidos por 50-100 dímeros (Ruggeri *et al.*, *Thromb. Haemost.* 82: 576-584, 1999). La semivida *in vivo* del VWF humano en la circulación humana es de aproximadamente 12 a 20 horas.

25 Se sabe que el VWF estabiliza el FVIII *in vivo* y, de esta manera, desempeña una función crucial en la regulación de los niveles plasmáticos del FVIII y, como consecuencia, es un factor esencial para controlar la hemostasia primaria y secundaria. También se sabe que después de la administración intravenosa de preparados farmacéuticos que contienen el VWF a pacientes que padecen la enfermedad de von Willebrand (VWD) se puede observar un aumento en el FVIII:C endógeno de 1 a 3 unidades por mL en 24 horas, lo que demuestra el efecto estabilizador *in vivo* del VWF sobre el FVIII.

30 El VWF se puede preparar a partir de plasma humano, por ejemplo, tal como se describe en el documento EP05503991. El documento EP0784632 describe un método para aislar el VWF recombinante.

El trastorno hemorrágico heredado más frecuente en los seres humanos, con una prevalencia de aproximadamente un 0.8% a un 1.3% es el síndrome de von Willebrand o la enfermedad de von Willebrand (VWD), que puede tratarse mediante una terapia de sustitución con concentrados que contienen el VWF de origen plasmático o recombinante.

35 Existen cuatro tipos hereditarios de la VWD descritos, el tipo 1, el tipo 2, el tipo 3 y el tipo trombocítico. Estas son formas heredadas y adquiridas de la VWD. La mayoría de los casos son hereditarios, pero se han descrito formas adquiridas de la VWD. La clasificación de la Sociedad Internacional sobre la Trombosis y Hemostasia (ISTH, por sus siglas en inglés) depende de la definición de los defectos cualitativos y cuantitativos.

VWD de tipo 1

40 La VWD de tipo 1 (60-80% de todos los casos de la VWD) es un defecto cuantitativo, pero puede que no presente una coagulación claramente deficiente. La mayoría de los pacientes consiguen llevar una vida casi normal. Pueden surgir complicaciones en forma de hemorragias tras la cirugía (incluidos los procedimientos dentales), una perceptible facilidad para la aparición de equimosis o menorragia (periodos abundantes). Se detecta una reducción de los niveles del VWF (un 10-45% del normal, es decir 10-45 UI).

VWD de tipo 2

45 La VWD de tipo 2 (10-20%) es un defecto cualitativo y la tendencia a las hemorragias puede variar de un individuo a otro. Existen niveles normales del VWF, pero los multímeros son anómalos estructuralmente o hay una ausencia de subgrupos de multímeros grandes o pequeños. Existen cuatro subtipos principales: 2A, 2B, 2M y 2N.

VWD de tipo 2A

50 Esta es una anomalía de la síntesis o proteólisis de los multímeros del VWF que desemboca en la presencia de unidades multiméricas pequeñas en la circulación. La unión al Factor VIII es normal. La VWD de tipo 2A da lugar a una actividad del cofactor ristocetina desproporcionadamente baja en comparación con el antígeno de von Willebrand.

VWD de tipo 2B

Esta es un defecto de “aumento de la función” que da lugar a la unión espontánea a los trombocitos y el rápido aclaramiento posterior de los trombocitos y los multímeros del VWF grandes. Puede ocurrir una trombocitopenia moderada. Los multímeros del VWF grandes están ausentes de la circulación y la unión al Factor VIII es normal.

5 VWD de tipo 2M

Esta está causada por una disminución o ausencia de la unión a la GPIb sobre los trombocitos. La unión al Factor VIII es normal.

VWD de tipo 2N (de Normandía)

10 Esta es una deficiencia de la unión del VWF al factor VIII. Este tipo presenta un nivel de antígeno del VWF normal y resultados de la prueba funcional normales, pero tiene poco Factor VIII. Esto, probablemente, ha dado lugar a que algunos pacientes de 2N hayan sido diagnosticados erróneamente en el pasado como pacientes que padecían la hemofilia A.

VWD de tipo 3

15 El tipo 3 (1-3%) es la forma más grave de la VWD, en la que no está presente el VWF funcional y puede provocar hemorragias mucosas graves, no hay antígeno del VWF detectable y también puede provocar unos niveles del Factor VIII suficientemente bajos para dar lugar a hemartrosis (hemorragias en las articulaciones), como en casos de hemofilia moderada.

VWD de tipo trombocítica

20 La VWD de tipo trombocítica es un tipo autosómico dominante de la VWD provocado por el aumento de la función de las mutaciones de los receptores del VWF sobre los trombocitos; específicamente, la cadena alfa del receptor glucoproteína Ib (GPIb). Esta proteína es parte de un complejo más grande (GPIb/VI/IX) que forma el receptor del VWF completo sobre los trombocitos. La actividad de la ristocetina y la pérdida de multímeros del VWF grandes es similar al tipo 2B, pero las pruebas genéticas del VWF no revelarán mutaciones.

25 Además de los defectos cuantitativos o cualitativos del VWF, la ausencia de receptores específicos sobre la superficie de los trombocitos u otras anomalías trombocíticas pueden afectar a la agregación trombocítica dependiente del VWF. La molécula del VWF tiene sitios de unión específicos para los receptores de los trombocitos GPIb y GPIIb/IIIa, FVIIIc, colágeno, sulfátidos, heparina y la proteína botrocetina derivada del veneno de serpiente. La agregación de los trombocitos es una consecuencia de los contactos entre trombocitos. Este contacto está mediado por el fibrinógeno y el VWF y requiere la presencia de receptores sobre la superficie de los trombocitos. En su estado de reposo los trombocitos son no trombogénicos, pero exponen los receptores cuando se inicia la agregación de los trombocitos y se activan los trombocitos. La carencia de los receptores correspondientes para el VWF o una activación deficiente provoca hemorragias graves, tal como se observa en el síndrome de Bernard Soulier, un trastorno congénito con una deficiencia de la GPIb. Al contrario que la mutación con “aumento de la función” de la GPIb en la VWD de tipo trombocítica, en el síndrome de Bernard Soulier una mutación con “pérdida de la función” en el receptor GPIb para el VWF provoca el fenotipo clínico. El fenotipo clínico es comparable al de la VWD, pero ni la cantidad ni la actividad del VWF varían.

Enfermedad de von Willebrand adquirida

40 La VWD adquirida es un trastorno hemorrágico con resultados en el laboratorio similares a los de la VWD congénita. A diferencia de la forma congénita, la VWD adquirida normalmente se presenta en individuos que no tienen antecedentes personales ni familiares de trastornos hemorrágicos. La VWD adquirida está asociada con trastornos linfomioproliferativos, inmunológicos y cardiovasculares, así como también con tumores sólidos y otras afecciones variadas. La VWD adquirida puede presentarse en pacientes con autoanticuerpos. En este caso la función del VWF no está inhibida pero el complejo VWF-anticuerpo sufre un rápido aclaramiento de la circulación. La VWD adquirida es probablemente la causa de muchos casos de trastornos hemorrágicos adquiridos que no son diagnosticados debido a que se carece de pruebas específicas para la VWD en la mayoría de los laboratorios para análisis corrientes. Otra forma de la VWD ocurre en pacientes con estenosis de la válvula aórtica, lo que desemboca en una hemorragia gastrointestinal (síndrome de Heyde).

50 En la actualidad, se requieren varias pruebas, muchas de las cuales son complejas y requieren mucho tiempo, para el diagnóstico y la clasificación de la VWD, ya que ninguna prueba única es ideal. Algunas son pruebas de la coagulación generales que evalúan un riesgo hemorrágico general, como la determinación de PTT, FVIII:C y el tiempo de hemorragia, mientras que otras pruebas están relacionadas específicamente con el VWF, como la determinación del antígeno del VWF (VWF:Ag).

En la actualidad, las pruebas de cribado corrientes de la coagulación, por ejemplo, el recuento de trombocitos, el

tiempo activado de tromboplastina parcial y el tiempo de hemorragia, no son sensibles para detectar las anomalías de la coagulación causadas por la VWD o los defectos de los trombocitos que reducen la interacción entre el VWF y los trombocitos. El tiempo de hemorragia es bastante variable y no se correlaciona bien con la actividad del cofactor ristocetina (VWF:RCo) o el antígeno del VWF (VWF:Ag) en plasma. Por lo tanto, el tiempo de hemorragia no es una prueba de cribado útil para la VWD.

Algunas pruebas más complejas del VWF son el antígeno del VWF (WF:Ag), actividad del cofactor ristocetina (VWF:RCo), el ensayo de unión al colágeno (VWF:CBA), el análisis de la agregación de trombocitos inducida por la ristocetina (RIPA, por sus siglas en inglés), el ensayo de unión de VWF:FVIII y el análisis especialmente lento del patrón de multímeros del VWF. La proteína VWF se cuantifica mediante el procedimiento del ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o tecnologías automáticas más recientes. No refleja las propiedades activas, funcionales o adhesivas del VWF. En la actualidad, el ensayo del cofactor ristocetina es el único ensayo funcional del VWF utilizado corrientemente que se realiza utilizando la aglutinación de los trombocitos. Sin embargo, tiene varias limitaciones, incluidas una baja reproducibilidad y una baja correlación entre laboratorios. Se ha desarrollado el VWF:CBA como un ensayo funcional alternativo, basado en la técnica ELISA que ofrece la posibilidad de ser más reproducible. El VWF:CBA es especialmente sensible a la pérdida de multímeros del VWF de peso molecular elevado. El ensayo de unión del VWF:FVIII evalúa la capacidad del VWF para unirse al FVIII y se utiliza para diagnosticar el tipo 2N. El procedimiento RIPA requiere plasma rico en trombocitos de un individuo para determinar la sensibilidad a la ristocetina con diversas concentraciones. La sensibilidad a la ristocetina depende tanto del nivel como de la función del VWF. El ensayo VWF:multímero conlleva la electroforesis en gel para detectar el VWF con diferentes pesos moleculares e identificar ciertas anomalías estructurales del VWF. El análisis multimérico permitirá la asignación en los diferentes subtipos. Debido a la complejidad, tiempo y coste de la prueba únicamente un pequeño número de laboratorios especializados la llevan a cabo. Asimismo, debido al tiempo transcurrido y a la manipulación de la muestra cuando se envían las muestras a los laboratorios especializados, a veces se obtienen resultados erróneos debido a la pérdida de formas del VWF con un elevado peso molecular.

Además, el diagnóstico de la VWD y la disfunción de trombocitos también se puede llevar a cabo con el analizador automático PFA100 (Siemens Medical Solution Diagnostics) que mide la hemostasia primaria en condiciones con un cizallamiento elevado aspirando muestras sanguíneas no coaguladas con una presión negativa constante a través de una abertura pequeña. Se forma un tapón de trombocitos en la abertura y se determina el tiempo necesario para que se produzca el cese del flujo sanguíneo (tiempo de cierre). Se ha demostrado que la función de los trombocitos y los niveles del VWF son elementos determinantes importantes del tiempo de cierre (E.J. Favaloro, *Seminars in Thrombosis and hemostasis* 32: 456-471, 2006). En los ensayos con el PFA100 no se induce la cascada de coagulación plasmática intrínseca ni la extrínseca, p. ej., la coagulación plasmática que conlleva la formación de fibrina no tiene lugar.

El documento US 5 951 951 proporciona un método mejorado para medir el tiempo de coagulación activado en muestras sanguíneas con citrato que contienen trombocitos introduciendo un paso de recalcificación previo a la prueba en el cual un anticoagulante garantiza que la coagulación no comience prematuramente. Se propone añadir a la muestra sanguínea con citrato simultáneamente (a) un agente restaurador de la función trombocítica, (b) un anticoagulante y (c) a al menos una parte de la muestra un agente activador de trombocitos. Después de la recalcificación previa a la prueba se induce la coagulación añadiendo un agente coagulante. A continuación, se puede medir la coagulación de diversas maneras incluida la determinación de un cambio en la viscosidad. La función del agente activador de trombocitos es que potencia, en condiciones normales, la capacidad de los trombocitos para participar de manera eficaz en la reacción de coagulación de la sangre y, de esta manera, acorta el tiempo de coagulación. Por lo tanto, la adición del agente activador de trombocitos da lugar, en muestras procedentes de donantes normales sanos, a un aumento en la viscosidad en comparación con una muestra del mismo donante al cual no se le añade activador de trombocitos, mientras que en muestras procedentes de donantes con defectos trombocíticos la adición del agente activador de trombocitos da lugar a un acortamiento reducido del tiempo de coagulación, p. ej., un aumento reducido de la viscosidad o sin cambio en absoluto, en comparación con una muestra del mismo donante a la cual no se ha añadido activador de trombocitos. El método de prueba divulgado tiene el objeto de proporcionar un método para detectar defectos trombocíticos.

El documento WO 99/41615 divulga un método para evaluar la actividad coagulante de la sangre midiendo la velocidad de la coagulación de la sangre en presencia de ciertos iones metálicos. Una muestra de un donante se divide en al menos dos muestras y al menos a una de ellas se añaden iones metálicos. En una realización de la invención, se mide un cambio en la viscosidad. En esta realización, la coagulación plasmática no se induce, sino que se añade un ion metálico a al menos una muestra y, posteriormente, se mide el cambio relativo de viscosidad entre las dos muestras. Antes de medir el cambio en la viscosidad, se puede añadir opcionalmente un activador de trombocitos. Sin embargo, este método no considera añadir un activador de trombocitos únicamente a una muestra y no a la otra muestra y comparar la diferencia en la cantidad de cambio viscoelástico provocado por este tratamiento diferencial.

En años recientes, en la práctica clínica se ha introducido la técnica analítica de la tromboelastografía. La tromboelastografía (TEG, por sus siglas en inglés) es un método diagnóstico que estudia mecánicamente la

formación o disolución del coágulo en un sistema oscilante. En este, un recipiente (vaso) tiene un movimiento oscilante alrededor de una barra (husillo) medidora (TEG convencional) o el recipiente está fijo y se confiere a la barra un movimiento rotatorio oscilante (ROTEG o ROTEM). Se registran las fuerzas mecánicas que surgen entre el recipiente y la barra. Tan pronto como la sangre o el plasma comienza a coagular, ocurre una variación en la señal de medida inicial. Ambos diseños se denominarán en la presente TEG.

La TEG se emplea para estudiar la sangre o el plasma con el fin de determinar parámetros de coagulación relevantes (parámetros TEG) tales como el periodo de tiempo hasta alcanzar una primera formación significativa de un coágulo con una amplitud de 2 mm (tiempo de coagulación o reacción r), el periodo de tiempo hasta alcanzar un grosor del coágulo con una amplitud de 20 mm (valor k), la velocidad a la cual se forma el coágulo (ángulo alfa), las propiedades mecánicas del coágulo con una amplitud máxima (MA, por sus siglas en inglés) o en cualquier otro punto temporal deseado, el periodo de tiempo hasta la MA (TMA, por sus siglas en inglés) o el periodo de tiempo hasta que la resistencia del coágulo ha disminuido de nuevo hasta un cierto valor debido a la fibrinólisis. Clínicamente, se emplea la TEG como una medida diagnóstica, entre otros, para evaluar la coagulopatía, por ejemplo, en la cirugía cardíaca, en el trasplante de hígado, en la cirugía abdominal mayor y como una prueba casi de cabecera en el control de la coagulación perioperatoria.

La TEG está disponible, además de las pruebas diagnósticas de coagulación estándar (tiempo de tromboplastina, aPTT, recuento de trombocitos, ATIII, fibrinógeno, dímeros D, tiempo de hemorragia) que requieren mucho más tiempo, para la determinación de los valores que proporcionan una información rápida sobre los patrones hemorrágicos. Esto es especialmente importante si ocurren coagulopatías en el transcurso de intervenciones quirúrgicas importantes o después de politraumatismos, debido a que los trastornos serios de la hemostasia pueden dar lugar rápidamente al desarrollo de daño tisular secundario y son a menudo resistentes a una terapia hemostática convencional que utiliza un diagnóstico de la coagulación estándar que requiere mucho más tiempo.

El atractivo del método reside en su aspecto global, estando el resultado influenciado por factores de coagulación y rutas fibrinolíticas, de trombocitos e inhibidores (Luddington, *Clin. Lab. Haem.* (2005) 27, 81-90). Esto proporciona la posibilidad de identificar los mecanismos principales que contribuyen a una hemostasia y coagulación defectuosas en la muestra de una manera más instructiva que las pruebas de cribado de la coagulación mucho más artificiales. Los parámetros TEG están influenciados por varios factores, especialmente los niveles de fibrinógeno, factor XIII y trombocitos sanguíneos y componentes del sistema fibrinolítico tales como la plasmina, activadores de la plasmina e inhibidores de la plasmina. Por ejemplo, el fibrinógeno, como un sustrato de la coagulación, se correlaciona con la estabilidad del coágulo. Esto puede apreciarse claramente en el tromboelastograma. Asimismo, la ausencia de factores de coagulación como el FVIII o el FIX puede ser detectada con la tromboelastografía.

El coágulo se forma por la interacción de la fibrina con los trombocitos activados. Las hebras de fibrina y los agregados de trombocitos determinan tanto la resistencia mecánica del coágulo formado como las propiedades viscoelásticas de la muestra. Los trombocitos agregados asociados con el VWF y la fibrina contribuyen en aproximadamente un 80% a las propiedades viscoelásticas y la fibrina contribuye en aproximadamente un 20% (p. ej., la amplitud máxima medida según la TEG) en muestras normales.

Tal como se ha expuesto anteriormente, la tromboelastografía se usa en la actualidad para el análisis de varios defectos de la coagulación, como la hemofilia A y B, trombocitopenia, trombopatía, hipercoagulación así como también de defectos en el sistema fibrinolítico (remítase a la figura 1) (R.J. Luddington, *Clin. Lab. Haem.* 27: 81-90, 2005). El documento WO 2006/084648 describe la utilización de la TEG para diferenciar entre un estado de deficiencia de fibrinógeno y del Factor XIII.

Recientemente, un tromboelastograma de rotación modificado (ROTEM®, Pentapharm, Munich, Alemania) ha evitado varias limitaciones de la TEG clásica. Se dispone de cuatro canales para medidas simultáneas. Cada prueba requiere 300 µL de sangre entera con citrato. La activación de la coagulación se puede realizar con distintos activadores posibilitando la evaluación de diferentes rutas de activación. Se pueden realizar cuatro ensayos ROTEM® estándar, denominados INTEM, EXTEM, NATEM y FIBTEM, de acuerdo con los protocolos proporcionados por el proveedor. INTEM y EXTEM representan ensayos en los cuales se desencadenan las rutas de coagulación intrínseca o extrínseca. Se utiliza NATEM (TEM no activada) para evaluar la formación del coágulo en sangre entera en ausencia de una activación de la cascada de coagulación que no sea la recalcificación y la activación por contacto espontáneo. Finalmente, se puede utilizar el ensayo FIBTEM para evaluar la función específica del fibrinógeno en la formación del coágulo tras la inhibición de los trombocitos por parte de la citocalasina D. En el caso de INTEM y EXTEM, se recalcifican 300 µL de sangre con citrato con 20 µL de CaCl₂ 0.2 M (reactivo star-TEM®, Pentapharm, GmbH, Munich, Alemania) y la cascada de coagulación es activada por los fosfolípidos de la tromboplastina parcial generados con cerebro de conejo más ácido elágico (reactivo in-TEM®, Pentapharm GmbH, Munich, Alemania) y tromboplastina de cerebro de conejo (reactivo ex-TEM®, Pentapharm GmbH, Munich, Alemania), respectivamente. En el caso de FIBTEM, se mezclan 300 µL de sangre con citrato con 20 µL de reactivo ex-TEM® más 20 µL de una solución de citocalasina D/DMSO, CaCl₂ 0.2 M (reactivo fib-TEM®, Pentapharm GmbH, Munich, Alemania).

Se ha demostrado que ROTEM® es un dispositivo de análisis inmediato para un diagnóstico rápido en diversos trastornos hemorrágicos y para la evaluación global del estado de coagulación en pacientes con afecciones hipercoagulables. En particular, este método ofrece la posibilidad de ejemplificar la hipocoagulación que se observa normalmente en trastornos tales como la hemofilia, diversas deficiencias de un factor de coagulación y trastornos trombocíticos. Además, la sustitución experimental *ex vivo* con varios componentes que promueven la hemostasia ha revelado que ROTEM® es útil para ejemplificar la corrección de una capacidad hemostática comprometida.

Sin embargo, la TEG no se ha utilizado hasta la fecha para diagnosticar un mayor riesgo hemorrágico asociado con la VWD o defectos trombocíticos que reducen la interacción del VWF con los trombocitos.

En la práctica clínica es necesario determinar el riesgo hemorrágico de un paciente antes de llevar a cabo una cirugía. Cuando una prueba de coagulación general como, p. ej., el PTT, está elevada e indica un mayor riesgo hemorrágico, con el fin de determinar la causa del mayor PTT es necesario realizar varias pruebas adicionales que a menudo conllevan también alguna prueba que requiere mucho más tiempo como, p. ej., el análisis de multímeros del VWF.

Si aún no se dispone de los resultados de estas pruebas, no se permite que los pacientes que no padecen indicaciones que pueden ser letales se sometan a la operación quirúrgica programada y la cirugía se pospone a menudo hasta varias semanas.

Por lo tanto, existe una necesidad médica importante de una prueba para identificar el riesgo hemorrágico de un paciente individual, así como también su función del VWF, donde la prueba debería proporcionar resultados rápidos, siendo idealmente una prueba de análisis inmediato adecuada para análisis con sangre entera que requiera únicamente pequeñas muestras sanguíneas. El problema resuelto por la presente invención era proporcionar una prueba de este tipo.

Sorprendentemente, en la presente invención se descubrió que existe una manera de utilizar la determinación de un cambio de la viscoelasticidad en una tromboelastografía para evaluar deficiencias del VWF, incluidas tanto deficiencias cualitativas como cuantitativas de la VWD y el riesgo hemorrágico asociado con la enfermedad de von Willebrand y los defectos de la función trombocítica adquiridos o congénitos que reducen la interacción del VWF con los trombocitos. La presente invención proporciona un ensayo rápido para la VWD y el defecto de la función trombocítica que incluye una prueba de análisis inmediato o de cabecera adecuada para el uso de la tromboelastografía con sangre entera.

Aún más sorprendentemente, se observó que la prueba es capaz de determinar qué pacientes padecen enfermedades por defecto del almacenamiento de trombocitos y disfibrirogenemia. Aparentemente, la interacción de los trombocitos requiere un proceso de múltiples pasos y, aparentemente, participan diferentes mecanismos a través de diferentes receptores. Las interacciones entre diversas proteínas que se adhieren a trombocitos tales como el fibrinógeno o von WWF y sus respectivos receptores superficiales median en la interacción entre los trombocitos y pueden desembocar en una diátesis hemorrágica clínicamente manifiesta. También se ha informado de esto en las proteínas intracelulares secretadas desde los gránulos de los trombocitos durante la activación de los trombocitos.

También se ha observado que la prueba se puede realizar con fluidos corporales, preferentemente sangre, en volúmenes tan pequeños como 105 µL por prueba, lo que supone una enorme ventaja, especialmente en el diagnóstico de pacientes pediátricos y recién nacidos. Por lo tanto, la invención también engloba pruebas para determinar el riesgo hemorrágico de un paciente dado debido a la VWD, defectos trombocíticos, enfermedades por defecto del almacenamiento de trombocitos y disfibrirogenemia en muestras sanguíneas de 300 µL por prueba como máximo, preferentemente 200 µL por prueba como máximo y de la manera más preferida 105 µL por prueba como máximo. Una realización sumamente preferida de la invención consiste en determinar el riesgo hemorrágico a partir de muestras sanguíneas menores de 105 µL.

Figuras:

45 Figura 1:

La Figura 1 muestra un tromboelastograma normal comparado con tromboelastogramas de diversos defectos en la coagulación.

Figura 2:

La Figura 2 muestra que incubando sangre con citrato con cantidades crecientes de ristocetina (hasta una concentración final de 1.05 mg/mL, la amplitud máxima disminuye y el tiempo de coagulación aumenta.

Figura 3:

La Figura 3 muestra que cuando se realiza un análisis tromboelastográfico de sangre normal la amplitud máxima después de una preincubación con ristocetina alcanza tan solo aproximadamente un 20% de la amplitud máxima sin

tal preincubación con ristocetina. En sangre procedente de un paciente de la VWD de tipo 3, se alcanza una amplitud máxima de casi un 100% incluso con una preincubación con ristocetina, y en sangre procedente de un paciente de la VWD de tipo 1 es de aproximadamente un 75%.

Figura 4:

- 5 La Figura 4 muestra que la relación entre la amplitud máxima con una preincubación con ristocetina y la amplitud máxima sin una preincubación con ristocetina proporciona un parámetro diagnóstico para diferenciar entre individuos sanos y pacientes que padecen la VWD. El descenso de la amplitud máxima es una función de la concentración de ristocetina tal como se observa en la figura 3 y la figura 2.

Figura 5:

- 10 La Figura 5 muestra la relación entre la amplitud máxima para miembros de una familia en la que todos padecen la VWD de tipo 1. Los pacientes muestran una gran variación en su manifestación clínica que se correlaciona con la relación observada entre las amplitudes.

Figura 6:

- 15 La Figura 6 muestra la normalización de la relación entre las amplitudes máximas ($[(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida})/(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida})]*100$) después de añadir Haemate (0.5 U/mL) *in vitro* a la sangre con citrato de un paciente de la VWD de tipo 3.

Figura 7:

- 20 La Figura 7 muestra el aumento de la actividad del cofactor ristocetina y de VWF:Ag y el correspondiente descenso de la relación entre las amplitudes máximas ($[(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida})/(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida})]*100$) después de la administración de DDAVP a tres pacientes de la VWD de tipo 1 (pac. 1 a pac. 3) en tres puntos temporales (antes, 30 min después y 180 min después de la administración de DDAVP).

Figura 8:

- 25 La Figura 8 muestra la relación entre las amplitudes máximas ($[(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida})/(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida})]*100$), la actividad del cofactor ristocetina y VWF-Ag antes y después de la administración de un concentrado de VWF a un paciente de la VWD de tipo 2 antes y después de la sustitución con un concentrado de VWF (33 U/kg de Haemate®).

30 **Figura 9:**

- La Figura 9 presenta muestras en las que se determinó que la relación entre las amplitudes máximas era igual o superior a un 15% ($[(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida})/(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida})]*100 \geq 15\%$). Los pacientes se clasificaron en tres grupos de acuerdo con la clasificación del laboratorio de referencia (grupo 1: pacientes con la VWD (1: VWD de tipo 1, 2: VWD de tipo 2, 3: VWD de tipo 3, M: fenotipo moderado de la VWD de tipo 1, grupo 2: O: pacientes con otros trastornos hemorrágicos clasificados, grupo 3: pacientes sin la VWD, N: sin la VWD, E: VWD equívoca)).
- 35

Figura 10:

- 40 La Figura 10 presenta muestras en las que se determinó que la relación entre las amplitudes máximas era inferior a un 15% ($[(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida})/(\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida})]*100 < 15\%$). Los pacientes se clasificaron en tres grupos de acuerdo con la clasificación del laboratorio de referencia (grupo 1: pacientes con la VWD (1: VWD de tipo 1, 2: VWD de tipo 2, 3: VWD de tipo 3, M: fenotipo moderado de la VWD de tipo 1, grupo 2: O: pacientes con otros trastornos hemorrágicos clasificados, grupo 3: pacientes sin la VWD, N: sin la VWD, E: VWD equívoca)).

45 **Compendio de la invención**

- La invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de von Willebrand y el riesgo hemorrágico asociado con la enfermedad de von Willebrand y los trastornos de la función trombocítica. El método es adecuado para su uso como un método de cribado con sangre entera y tiene el beneficio adicional de ser adecuada como una prueba de diagnóstico inmediato. El método de la invención es superior para predecir el riesgo hemorrágico en comparación con los métodos diagnósticos conocidos como el recuento de trombocitos, el tiempo
- 50

activado de tromboplastina parcial y el tiempo de hemorragia.

Descripción detallada de la invención

5 La invención se refiere a la medida de los cambios viscoelásticos y a la comparación de la cantidad de cambios viscoelásticos en muestras sanguíneas después de inducir la coagulación. La cantidad total del cambio viscoelástico en una muestra procedente de una persona sana después de inducir la coagulación se debe en parte de la red de fibrina que se forma después de inducir la coagulación plasmática y en parte de la agregación de los trombocitos activados (que son activados durante la coagulación por la trombina), el VWF y la red de fibrina.

10 La idea central de la invención es que la incubación de una muestra sanguínea procedente de un donante sano que comprende trombocitos y el VWF con un activador de la agregación de trombocitos antes de la coagulación plasmática proporciona suficiente trombina y fibrina para unir entre sí los trombocitos en la muestra lo que provocará una preagregación casi completa de los trombocitos. Sin embargo, esta preagregación tiene como prerrequisito que la interacción entre el VWF y los trombocitos sea normal, lo que significa que el donante no tiene un mayor riesgo hemorrágico.

15 Debido a que los trombocitos preagregados no contribuyen a la cantidad total de cambio viscoelástico de manera similar a los trombocitos no preagregados, si entonces se induce la coagulación en la muestra en la cual los trombocitos se han preagregado y se genera la red de fibrina, se observa únicamente una cantidad reducida de cambio viscoelástico en comparación con la cantidad de cambio viscoelástico en una muestra que no se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos. Esta cantidad menor de cambio viscoelástico en la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos se comparará después con un valor de referencia o con la cantidad de cambio viscoelástico en una muestra similar procedente del mismo donante que no se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos. Una diferencia grande entre ambas cantidades de cambios viscoelásticos da lugar a un diagnóstico según el cual el donante no presenta un aumento de riesgo hemorrágico.

25 Por el contrario, en una muestra procedente de un donante con un mayor riesgo hemorrágico debido a una interacción comprometida entre el VWF y los trombocitos, la preagregación de los trombocitos y el VWF también se ve comprometida y tiene lugar en menor grado o no tiene lugar en comparación con una muestra procedente de un donante sano. Cuando entonces se inicia la coagulación (ya que la preagregación no tuvo lugar o tuvo lugar en menor grado) los trombocitos aún pueden contribuir a la cantidad total de cambio viscoelástico. Por lo tanto, en una muestra procedente de un donante con un mayor riesgo hemorrágico, se mide una cantidad de cambio viscoelástico normal, grande después de inducir la coagulación también en una muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos. Esta cantidad de cambio viscoelástico normal, grande en la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos se comparará entonces con un valor de referencia o con la cantidad de cambio viscoelástico en una muestra similar procedente del mismo donante que no se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos. La diferencia pequeña entre ambas cantidades de cambio viscoelástico da lugar a un diagnóstico según el cual el donante presenta un aumento de riesgo hemorrágico.

35 A modo de ejemplo no limitante, los valores de referencia se pueden determinar en donantes sanos sin un riesgo hemorrágico más elevado, determinando la cantidad de cambio viscoelástico después de inducir la coagulación ya sea i) incubando con un activador de la agregación de trombocitos (=REFH+) o ii) no incubando con un activador de la agregación de trombocitos (=REFH-).

40 Por ejemplo, los valores de referencia también pueden determinarse utilizando muestras de donantes que proceden de donantes con un mayor riesgo hemorrágico.

Dependiendo de cómo se determine el valor de referencia, la interpretación será diferente tal como se muestra en la Tabla 1 para muestras de referencia generadas a partir de donantes sin un mayor riesgo hemorrágico (REFH+ o REFH-).

45 Tabla 1: Efecto de la adición de un activador de la agregación de trombocitos en el cambio viscoelástico dependiendo del riesgo hemorrágico de un donante de acuerdo con el método de la presente invención

Muestra	Incubación con un activador de la agregación de trombocitos	Cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra del donante después de inducir la coagulación	Diferencia de la cantidad de cambio viscoelástico entre una muestra del donante con activador de la agregación de trombocitos añadido (valor A o valor C) y i) muestra del donante sin activador de la agregación de trombocitos añadido (valor B o valor D) o ii) referencia REFH-	Diferencia de la cantidad de cambio viscoelástico entre una muestra del donante con activador de la agregación de trombocitos añadido (valor A o valor C) y iii) referencia REFH+	Diagnóstico del riesgo hemorrágico
Donante 1	Sí	Pequeña (= valor A)	Grande (= valor A respecto al valor B o a la referencia REFH-)	Pequeña (= valor A respecto a la referencia REFH+)	Sin mayor riesgo hemorrágico en el donante
	No	Grande (= valor B)			
Donante 2	Sí	Grande (= valor C)	Pequeña (=valor C respecto al valor D o a la referencia REFH-)	Grande (= valor C respecto a la referencia REFH+)	Mayor riesgo hemorrágico en el donante
	No	Grande (=valor D)			

Por lo tanto, un aspecto de la invención es un método diagnóstico *in vitro* para determinar defectos cualitativos y/o cuantitativos del factor de von Willebrand caracterizado por

- 5 a) utilizar una muestra obtenida a partir de un individuo humano o un animal que comprende un fluido corporal que comprende trombocitos y factores hemostáticos,
- b) incubar al menos una parte de la muestra con un activador de la agregación de trombocitos, donde el activador de la agregación de trombocitos es un compuesto que es capaz de inducir la activación, agregación y aglutinación de trombocitos dependientes del VWF en un fluido obtenido a partir del cuerpo humano que contiene trombocitos y el VWF provocando la unión del VWF al receptor del VWF en los trombocitos,
- 10 c) inducir la coagulación en la parte de la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos,
- d) medir el cambio viscoelástico que ocurre después de inducir la coagulación en la parte de la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos en un tromboelastógrafo, y
- 15 e) comparar la cantidad de cambio viscoelástico determinado en el paso (d) con un valor de referencia, donde el valor de referencia se obtiene:
 - 20 i) dividiendo la muestra original del donante obtenida en el paso (a) en al menos dos muestras u obtener en el paso (a) al menos dos muestras a partir de un donante donde en al menos una muestra únicamente se llevan a cabo el paso (a) y los pasos (c) a (e) y se omite el paso (b) y donde la cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra en la cual se ha omitido el paso (b) del método de la reivindicación 1 es el valor de referencia; o
 - ii) aplicando un método que comprende el paso (a) y los pasos (c) a (e) a una muestra procedente de un donante sano o a varias muestras procedentes de donantes sanos sin un mayor riesgo hemorrágico, donde la cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra o en las muestras en las que se omitió el paso (b)

es el valor de referencia; o

- iii) aplicando un método que comprende los pasos (a) a (e) a una muestra procedente de un donante sano o a varias muestras procedentes de donantes sanos sin un mayor riesgo hemorrágico donde la cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra o en las muestras es el valor de referencia.

5 Por lo tanto, en una muestra procedente de un paciente del VWF de tipo 1, la cantidad de cambio viscoelástico según se determina en el paso (d) es menor en comparación con la cantidad de cambio viscoelástico que se mide si se aplica el mismo método a otra muestra obtenida de la misma manera que en el paso (a) a partir del mismo paciente del VWF de tipo 1 pero a la que no se ha añadido activador de la agregación de trombocitos.

10 Una diferencia grande entre i) la cantidad de cambio viscoelástico medida en una muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos y ii) la cantidad de cambio viscoelástico de una muestra de referencia que no se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos da lugar a un diagnóstico en el que el donante de la muestra no presenta un aumento de riesgo hemorrágico;

15 mientras que una diferencia reducida entre i) la cantidad de cambio viscoelástico medida en una muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos y ii) la cantidad de cambio viscoelástico de una muestra de referencia que no se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos da lugar a un diagnóstico en el que el donante presenta un mayor riesgo hemorrágico.

20 Una diferencia pequeña entre i) la cantidad de cambio viscoelástico medida en una muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos y ii) la cantidad de cambio viscoelástico de la muestra de referencia que también se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos da lugar a un diagnóstico en el que el donante de la muestra no presenta un aumento de riesgo hemorrágico;

mientras que una diferencia grande entre i) la cantidad de cambio viscoelástico medida en una muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos y ii) la cantidad de cambio viscoelástico de la muestra de referencia que también se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos da lugar a un diagnóstico en el que el donante presenta un mayor riesgo hemorrágico.

25 Preferentemente, el paso (b) del método anterior se lleva a cabo antes del paso (c) del método anterior.

Opcionalmente, se puede añadir un activador de la coagulación cuando se lleva a cabo el método de la invención. Preferentemente el activador de la coagulación se añade antes o después de la adición de un activador de la agregación de trombocitos en el paso b) pero antes de inducir la coagulación en el paso c).

30 A diferencia del método divulgado en el documento US 5 951 951, el método de la invención no requiere la adición de un anticoagulante. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, no se añade anticoagulante a la muestra.

El fluido corporal original puede estar diluido y su composición puede cambiar siempre y cuando todavía comprenda trombocitos y factores hemostáticos.

35 Preferentemente, en el paso e) del método se determina la relación entre la cantidad de cambio viscoelástico de la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos y el valor de referencia tal como se ha detallado anteriormente.

40 Se pueden utilizar múltiples parámetros que pueden ser determinados mediante la TEG y que evalúan los cambios viscoelásticos para llevar a cabo el método de la invención, tal como la determinación de la amplitud máxima (MA), el área bajo la curva, la velocidad a la cual se forma el coágulo (ángulo alfa), la amplitud en puntos temporales definidos, parámetros de derivación. Se prefiere determinar el área o la amplitud máxima en el paso e) del método de la invención en ambas partes de la muestra original y se prefiere aún más determinar la relación entre las amplitudes máximas o las áreas bajo la curva de ambas partes de la muestra en el paso (f).

El "cambio viscoelástico" en el sentido de la invención es cualquier cambio de la viscosidad y la elasticidad de cizalladura de la muestra durante el proceso de coagulación y la formación del coágulo.

45 La "cantidad de cambio viscoelástico" en el sentido de la invención es la diferencia entre la viscosidad de la muestra antes de la inducción de la coagulación y después de un cierto punto temporal después de haber inducido la coagulación. El punto temporal preferido para medir la cantidad de cambio viscoelástico puede variar y depende también del parámetro que de hecho se esté midiendo.

50 El "activador de la agregación de trombocitos" en el sentido de la invención es cualquier composición de materia o cualquier compuesto que es capaz de inducir la activación, agregación y aglutinación de trombocitos dependiente del VWF en un fluido obtenido a partir del cuerpo humano que contiene trombocitos y el VWF al hacer que el VWF se una a los receptores del VWF en los trombocitos. Los activadores preferidos de la agregación de trombocitos son

la ristocetina y la botrocetina. El activador más preferido de la agregación de trombocitos es la ristocetina.

“Incubar” con un activador de la agregación de trombocitos en el sentido de la invención es añadir el activador de la agregación de trombocitos a una muestra que comprende trombocitos y el VWF durante al menos 0.1 min, preferentemente durante al menos 1 min, de la manera más preferida durante al menos 5 min.

- 5 Los “factores hemostáticos” en el sentido de la invención son un grupo de factores de coagulación que incluyen componentes de la cascada de coagulación intrínseca y extrínseca, la trombina y el fibrinógeno que generan fibrina a partir del fibrinógeno una vez que se ha activado la coagulación.

10 “Inducir la coagulación” en el sentido de la invención se refiere a cualquier manera de desencadenar o activar el sistema de coagulación dependiendo del tipo de la muestra y del anticoagulante utilizado que comprende la recalcificación, adición de antagonistas de anticoagulantes añadidos o de cualesquiera sustancias diferentes que conllevan la generación de fibrina a partir del fibrinógeno. En sangre entera no tratada, la coagulación puede haberse inducido previamente por el contacto con superficies como, por ejemplo, la superficie de la copa en la que se incubaba la sangre. Si se utiliza sangre con citrato o plasma rico en trombocitos, la coagulación se puede inducir mediante la adición de calcio. En el caso de sangre con heparina o plasma rico en trombocitos, la coagulación se puede inducir mediante la adición de heparinasa.

15 Preferentemente, se añade un activador de la agregación de trombocitos antes de inducir la agregación. Sin embargo, la invención también se puede llevar a la práctica induciendo simultáneamente la coagulación y la adición de un activador de la agregación de trombocitos. Una realización menos preferida pero que es todavía una realización factible de la invención comprende añadir el activador de la agregación de trombocitos después de haber inducido la coagulación.

20 Los “activadores de la coagulación” en el sentido de la invención son sustancias que activan uno o más factores de coagulación pero que por sí solos no conllevan la generación de fibrina en el fluido respectivo que comprende un fluido corporal que comprende trombocitos y factores hemostáticos. Una preincubación con tales activadores antes de inducir de hecho la coagulación ofrece ventajas significativas tales como la reducción de los tiempos de reacción mediante la activación controlada frente a únicamente una activación por contacto superficial y una mejor precisión. Un activador preferido de la coagulación es el caolín. Además, proporciona la posibilidad de obtener información diagnóstica diferencial adicional.

Preferentemente, se añade un activador de la coagulación antes de inducir la coagulación.

30 Si en la muestra está presente el VWF funcional y la función trombocítica es normal, la adición de un activador de la agregación de trombocitos antes, durante o después de inducir el proceso de coagulación conlleva la agregación de trombocitos y la activación de trombocitos. Estos trombocitos preagregados muestran una interacción diferente con la fibrina que se forma a partir del fibrinógeno en la formación del coágulo una vez que se induce la coagulación. Esto conlleva a un cambio muy reducido de la viscoelasticidad en la muestra en comparación con una muestra a la cual no se ha añadido activador de la agregación de trombocitos. En tales muestras procedentes de individuos sanos, se mide, por ejemplo, una MA grande en una TEG sin un activador añadido o agregación de trombocitos, pero una MA pequeña si se ha añadido un activador de la agregación de trombocitos.

35 En cambio, si en la muestra está presente el VWF con defectos cuantitativos o cualitativos, menos trombocitos, o ninguno, se agregan una vez que se ha añadido un activador de la agregación de trombocitos. Por lo tanto, cuando se induce la coagulación, siguen estando disponibles más trombocitos, o todos, que aún no se han agregado y que todavía pueden interaccionar con la fibrina que se forma durante el proceso de coagulación. Por lo tanto, el defecto cualitativo o cuantitativo del VWF puede determinarse, por ejemplo, mediante una MA grande en una TEG si se ha añadido un activador de la agregación de trombocitos.

40 El método de la presente invención también es capaz de diferenciar entre diferentes tipos de la VWD. Por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 3, cuando se lleva a cabo un análisis tromboelastográfico de sangre normal, la amplitud máxima después de una preincubación con ristocetina alcanza únicamente aproximadamente un 20% de la amplitud máxima sin tal preincubación con ristocetina. En sangre procedente de un paciente de la VWD de tipo 3, se alcanza una amplitud máxima de casi un 100% incluso con una preincubación con ristocetina, y en sangre procedente de un paciente de la VWD de tipo 1, la amplitud máxima se reduce hasta aproximadamente un 75%.

45 La adición de activadores de la agregación de trombocitos y la posterior unión de los complejos activador-VWF a los trombocitos conlleva la agregación de los trombocitos y también su activación. Esta activación depende de la unión de los complejos del VWF a sus correspondientes receptores en los trombocitos. Así pues, la respuesta a dichos activadores de la agregación de trombocitos también se ve afectada por la ausencia de los correspondientes receptores de trombocitos o una función trombocítica deficiente. Por lo tanto, por ejemplo, una MA grande en una TEG después de tratar la muestra con un activador de la agregación de trombocitos también puede estar causada por defectos en los trombocitos que conllevan una agregación de trombocitos dependiente del VWF deficiente como,

p. ej., en el caso del síndrome de Bernard Soulier.

Si se determina un cambio grande en la viscoelasticidad, como una MA grande en una TEG, llevando a la práctica el método de la invención, un diagnóstico de los defectos cualitativos o cuantitativos del VWF o una agregación de trombocitos dependiente del VWF deficiente puede basarse en a) la comparación del cambio grande en la viscoelasticidad haciendo referencia a un valor basado en un cambio predeterminado de viscoelasticidad en muestras de individuos sanos o b) por comparación con una parte de referencia de la muestra original que no se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos y en la cual también se ha inducido la coagulación.

Por lo tanto, el método de la invención ofrece una manera rápida de evaluar la ausencia o función deficiente del VWF y la disfunción trombocítica relacionada con el factor VWF y esto ofrece un método rápido para diagnosticar la VWD y los trastornos de la función trombocítica que reducen la interacción del VWF con los trombocitos. De manera aún más sorprendente se observó que la prueba es capaz de determinar qué pacientes padecen enfermedades por defecto del almacenamiento de trombocitos y disfibrinogenemia. El método de la invención es adecuado como análisis de cabecera lo que obvia la necesidad de otros métodos diagnósticos que requieren mucho más tiempo. Otra ventaja del método de la invención es que elimina la necesidad de pasos de centrifugación que requieren mucho tiempo. La prueba se puede realizar con volúmenes de sangre de tan solo 105 µL, lo que supone una enorme ventaja, especialmente para diagnosticar recién nacidos y pacientes pediátricos.

Una prueba de este tipo es especialmente útil cuando es necesario determinar un riesgo hemorrágico debido a la deficiencia del VWF o trastornos de la función trombocítica, como el síndrome de Bernard Soulier, cuando los resultados se necesitan rápidamente como, por ejemplo, en un contexto pre- y perioperativo. Existe constancia de varios trastornos y enfermedades asociadas, así como también varios fármacos, que afectan a la función trombocítica.

Al igual que el cambio en la viscoelasticidad, según está ejemplificado en un tromboelastograma, refleja el estado global del sistema coagulante y fibrinolítico en un donante concreto, las deficiencias congénitas en ciertos factores de coagulación, como en la hemofilia A o hemofilia B, la disminución de factores de coagulación como el fibrinógeno, como en el traumatismo o en la hemorragia quirúrgica, o la intervención farmacológica, como el tratamiento con cumarina, también estarán reflejadas en ciertos patrones característicos del cambio en la viscoelasticidad o el tromboelastograma (Luddington, *Clin. Lab. Haem.* (2005) 27, 81-90) que el experto en la técnica será capaz de interpretar. Así pues, el uso del método de acuerdo con la presente invención no solamente hace posible el diagnóstico de un mayor riesgo hemorrágico debido a receptores de trombocitos o al VWF deficientes que reducen la interacción del VWF con los trombocitos, sino que también hace posible el diagnóstico simultáneo de otras anomalías del sistema coagulante o fibrinolítico.

Por lo tanto, la puesta en práctica del método de acuerdo con la presente invención también permite diagnosticar la hiperfibrinólisis, la coagulopatía multifactorial debida a la pérdida de sangre, la hemorragia debida al uso de anticoagulantes, el estado hipocoagulante asociado con el traumatismo, el estado hipocoagulante asociado con el embarazo, la coagulación intravascular diseminada, la trombocitopenia, los trastornos hemorrágicos congénitos que ocasionan la carencia de factores de coagulación funcionales como el FVIII, FIX, FXIII y el fibrinógeno, enfermedades por defecto de almacenamiento de trombocitos y disfibrinogenemia.

El uso de reactivos y kits adecuados para evaluar la enfermedad de von Willebrand y el riesgo hemorrágico asociado con la enfermedad de von Willebrand y los defectos en la función trombocítica congénitos o adquiridos determinando los cambios viscoelásticos también es parte de la presente invención.

De manera sumamente sorprendente, se descubrió que incluso en casos en los que el diagnóstico convencional del VWF no es capaz de diagnosticar un riesgo hemorrágico diferencial entre diferentes pacientes, el método de la invención tal como se muestra en el Ejemplo 4 (a) predice la propensión hemorrágica en un paciente concreto de una manera más predictiva que los métodos conocidos. Tal como se muestra en el Ejemplo 4 (b), los individuos de los que se había diagnosticado erróneamente que padecían la VWD (probablemente debido a la pérdida de multímeros de la VWD durante el almacenamiento y el transporte, lo que es un fenómeno común), con el método diagnóstico *in vitro* de la invención se diagnosticó correctamente que estaban sanos y no presentaban un mayor riesgo hemorrágico. Por lo tanto, el método de la invención es, al menos en algunos casos, más fiable y robusto que los métodos convencionales de diagnóstico de la VWD.

También se podría mostrar (Ejemplo 5) que el método de la invención se puede utilizar para monitorizar el éxito o el fracaso de diferentes pautas terapéuticas como la administración de DDAVP o pacientes de la VWD o la hemofilia A o la administración de concentrados del VWF a pacientes de la VWD o la hemofilia A.

Tal vez uno de los rasgos más intrigantes del método de la invención es que no solamente ofrece un método de prueba sensible y específico para diagnosticar la VWD y/o defectos trombocíticos que podrían afectar a la unión del VWF a los trombocitos, sino que además identifica pacientes con un mayor riesgo hemorrágico, donde dicho riesgo se debe a veces a causas adicionales con una patogénesis un tanto confusa.

Esto podría deberse al hecho de que el método de la invención determina el riesgo hemorrágico de un individuo con sangre entera, donde los componentes plasmáticos y celulares del sistema coagulante están presentes y no han sido separados artificialmente como es el caso en muchos otros sistemas de prueba de la coagulación.

5 Por lo tanto, el método de la invención es un método rápido para predecir de manera fiable un riesgo hemorrágico en un individuo concreto y también restringe las posibles causas de tal riesgo hemorrágico.

El método de la invención se lleva a cabo preferentemente tal como se describe en los ejemplos.

10 Un fluido que comprende trombocitos y factores hemostáticos, como la sangre entera o sangre anticoagulada (por ejemplo, sangre con citrato o plasma rico en trombocitos con citrato o sangre con heparina o plasma rico en trombocitos con heparina) procedente de un paciente se transfiere a un vial que contiene opcionalmente un agente estandarizado que actúa como un activador de la coagulación, p. ej., caolín o factor tisular, pero sin de hecho inducir la coagulación en este momento temporal.

15 Preferentemente, los componentes se mezclan por inversión y, opcionalmente, se dividen en al menos dos alícuotas. Se añade una cantidad de un activador de la agregación de trombocitos a una de las alícuotas. Si se utiliza ristocetina, la concentración final está comprendida preferentemente entre 0.01 y 100 mg/mL más preferentemente entre 0.1 y 3 mg/mL o incluso más preferentemente entre 0.3 mg/mL y 1.5 mg/mL.

Las alícuotas se incuban preferentemente durante 0-360 min a entre 10 y 37 °C, más preferentemente 5 min a aproximadamente temperatura ambiente o 10 min a aproximadamente 37 °C, preferentemente, a la vez que se mezclan.

20 A continuación, ambas alícuotas se transfieren a un recipiente que permite la determinación del cambio viscoelástico, p. ej., copas de ensayo de TEG.

Preferentemente, después se induce la coagulación, pero la coagulación también puede inducirse simultáneamente o, de manera menos preferida, antes de la adición de un activador de la agregación de trombocitos.

El cambio viscoelástico se mide en ambas alícuotas, si se utiliza la TEG para determinar el cambio viscoelástico, el ensayo se ejecuta preferentemente hasta que se alcanza la amplitud máxima.

25 La muestra opcional sin adición de un activador de la agregación de trombocitos como la ristocetina se utiliza como una medida de control.

30 Si la TEG es el ensayo con el que se determina el cambio viscoelástico, la activación de trombocitos en respuesta al activador de la agregación de trombocitos, por ejemplo, la ristocetina, se puede determinar, a modo de ejemplo no limitante, a partir de las amplitudes máximas en el control sin añadir activador de trombocitos (MA) y la muestra con el activador de trombocitos ristocetina añadido ($MA_{\text{Ristocetina}}$): la cual se puede entonces expresar como la relación $(MA_{\text{Ristocetina}}/MA)*100$. Se determina el cambio porcentual para evaluar las respuestas de un sujeto individual, con el fin de proporcionar de esta manera una indicación de la respuesta relativa a cierta dosis de ristocetina. Se observó que con una concentración de ristocetina de 0.75 mg/mL, una relación de un 15% es un valor de corte preferido para identificar pacientes que presentan un mayor riesgo hemorrágico.

35 Si la relación $(MA_{\text{Ristocetina}}/MA)*100$ es igual o superior a un 15%, los pacientes presentan un mayor riesgo hemorrágico y parecen la VWD u otra diátesis hemorrágica y no deberían someterse a una cirugía antes de un diagnóstico adicional si una afección no potencialmente letal requiere cirugía inmediata.

Si la relación $(MA_{\text{Ristocetina}}/MA)*100$ es inferior a un 15%, no existe un mayor riesgo hemorrágico y los pacientes pueden someterse a cirugía.

40 Se debe sobreentender que esta relación de un 15% no es limitante y se utiliza únicamente como un ejemplo. Dependiendo de la técnica para determinar el cambio viscoelástico, dependiendo del parámetro individual medido, el experto en la técnica puede determinar una relación en función de las muestras, por ejemplo, a partir de pacientes con la VWD y a partir de pacientes sanos que diferencie los estados patológicos de los estados sanos.

45 Un objeto de la invención es un método diagnóstico *in vitro* donde un valor del (cambio viscoelástico en una muestra de un fluido corporal procedente de un donante con activador de la agregación de trombocitos añadido)/(cambio viscoelástico en una muestra del mismo fluido corporal sin activador de la activación de trombocitos añadido) igual o superior a 0.15 se interpreta que es un indicador de un riesgo hemorrágico. El riesgo hemorrágico puede deberse a la VWD pero también puede tener otras causas como se ha señalado anteriormente.

50 Los pacientes sin la VWD muestran un descenso significativo de la amplitud máxima después de la incubación con la ristocetina como se ha descrito en el ejemplo 2. Casi todos los trombocitos están desactivados y no se detecta una contribución adicional de los trombocitos a la fortaleza del coágulo después de la inducción posterior de la coagulación. Por el contrario, para los pacientes con la VWD la fortaleza del coágulo no está afectada, o solo

ligeramente, por la incubación con la ristocetina.

Resumiendo, el método diagnóstico *in vitro* de la invención es especialmente adecuado como una prueba de cribado. Un resultado positivo en esta prueba de cribado inicial estará seguida, en la mayoría de los casos, por pruebas de laboratorio más específicas como las pruebas de determinación de multímeros del VWF o de la función trombocítica, etc.

Ejemplos:

Ejemplo 1:

Se transfirió sangre estabilizada con citrato procedente de un paciente sano a un vial que contenía un reactivo de caolín estandarizado y se mezcló por inversión. El reactivo de caolín se adquirió de Haemoscope Corporation. La mezcla se mezcló bien y se dividió en dos alícuotas de 500 μL . Se añadieron diferentes cantidades de ristocetina con una concentración de 15 mg mL^{-1} a una parte de las alícuotas de sangre activada y ambas muestras se incubaron en un mezclador durante 10 min. Las copas de ensayo de la TEG se rellenaron con 300 μL de ambas alícuotas y se añadieron 20 μL de CaCl_2 0.2 M. Se permitió la ejecución de los rastreos de la TEG al menos hasta que se alcanzó la amplitud máxima utilizando un analizador Rotem. La figura 2 muestra cuatro patrones de la TEG distintos obtenidos. Dependiendo de la concentración de ristocetina final, se observaron un descenso de la amplitud máxima y un aumento del tiempo de coagulación.

Ejemplo 2:

El analizador y los reactivos procedieron de Haemoscope Corporation. Se recogieron 1.3 mL de sangre en citrato de trisodio al 3.18% (relación 1:9 entre el anticoagulante y la sangre). Se transfirió un mililitro de sangre estabilizada con citrato a un vial que contenía un reactivo de caolín estandarizado y se mezcló por inversión. La mezcla se mezcló bien y se dividió en dos alícuotas de 500 μL . Se añadieron 25 μL de ristocetina con una concentración de 15 mg mL^{-1} a una parte de las alícuotas de sangre activada y ambas muestras se incubaron en un mezclador durante 10 min. Las copas de ensayo de la TEG se rellenaron con 360 μL de ambas alícuotas y se añadieron 20 μL de CaCl_2 0.2 M. Se permitió la ejecución de los rastreos de la TEG al menos hasta que se alcanzó la amplitud máxima. La figura 3 muestra tres patrones de la TEG distintos obtenidos. La fig. 1 a muestra los perfiles de la TEG de una persona sana normal y la figura 1 b y la 1 c muestran los perfiles de la TEG de pacientes con la VWD de tipo 3 y de tipo 1.

Ejemplo 3:

De acuerdo con el procedimiento del ejemplo 2, se realizaron pruebas con muestras sanguíneas procedentes de pacientes sanos y procedentes de pacientes con la VWD. Todas las muestras de la VWD se obtuvieron a partir de pacientes de los que se había diagnosticado que padecían la VWD utilizando criterios estándar. Además del plasma de la VWD, también se recogieron varias muestras normales y se utilizaron para los estudios comparativos. La activación de los trombocitos en respuesta a la ristocetina se determinó a partir de las amplitudes máximas en el trazado del control (MA) y en la activación con ristocetina ($\text{MA}_{\text{Ristocetina}}:\text{MA}_{\text{Ristocetina}}/\text{MA} \times 100$). Se calculó el cambio porcentual para evaluar las respuestas de un sujeto individual, para proporcionar de esta manera una indicación de la respuesta relativa a cierta dosis de ristocetina (concentración final de 0.71 mg/mL y 1.05 mg/mL). La muestra inducida con caolín sin añadir ristocetina actuó como la medida de control. Los pacientes sin la VWD muestran un descenso significativo de la amplitud máxima después de la incubación con la ristocetina tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Casi todos los trombocitos están desactivados y no se detecta una contribución adicional de los trombocitos a la fortaleza del coágulo. Por el contrario, para los pacientes con la VWD la fortaleza del coágulo no está afectada, o solo ligeramente, por la incubación con la ristocetina.

Ejemplo 4:

- a) El diagnóstico de la VWD sigue siendo problemático y esto es particularmente cierto para la VWD de tipo 1. Muchos de estos sujetos no muestran las manifestaciones hemorrágicas y, por tanto, no son reconocidos. Los estudios de los miembros de las familias muestran que existe una penetrancia y una expresividad variables de la enfermedad. La variabilidad tanto de las manifestaciones hemorrágicas como de los resultados de los laboratorios entre miembros afectados de una familia indica una penetrancia y una expresividad variables de las mutaciones de la VWD (Miller CH, Graham JB, Goldin LR, Elston RC. Genetics of classic von Willebrand disease. I. Phenotypic variation within families. *Blood* 1979; 54: 117-36).

Los autores investigaron cuatro miembros de una familia que estaban todos ellos afectados con la VWD de tipo 1. Para cada individuo se obtuvieron los antecedentes familiares y hemorrágicos detallados mediante una entrevista personal. Los pacientes mostraron diferentes patrones tromboelastográficos (TEG) que se correlacionan con sus presentaciones clínicas. El paciente H que presenta la relación más elevada muestra meno-metrorragia, hemorragia después de una extracción dental y síntomas hemorrágicos cutáneos. Por el contrario, hasta la fecha no se han comunicado manifestaciones hemorrágicas para los otros tres

pacientes.

Por lo tanto, el método diagnóstico de la invención fue superior a los ensayos diagnósticos clásicos para predecir el riesgo hemorrágico de un miembro H de la familia. No se observó correlación para las pruebas de cribado de la coagulación tiempo de protrombina y tiempo activado de tromboplastina parcial.

- 5 b) Muchas variables preanalíticas provocan problemas sustanciales para la identificación de la VWD. Además, el VWF y en particular el VWF de peso molecular elevado, es muy sensible a los artefactos de recogida y transporte. Un transporte a baja temperatura y/o el almacenamiento de plasma con citrato de sodio dará lugar a la pérdida de HMW VWF (siglas en inglés de factor de von Willebrand de peso molecular elevado) en un subconjunto de muestras. En estos casos, podrá ocurrir una identificación errónea o una conclusión
10 falsa de la VWD cuando los resultados de las pruebas de laboratorio se acepten sin una confirmación repetida.

Sorprendentemente, en 103 muestras con las que se realizaron pruebas, los autores observaron que el método diagnóstico *in vitro* de la invención detectaba correctamente la ausencia de la VWD en dos casos en los que un diagnóstico convencional basado en la determinación del múltímero dio lugar a la clasificación errónea en la que los
15 pacientes tenían la VWD. Ambos pacientes fueron clasificados de acuerdo con el diagnóstico convencional basado en el patrón del múltímero como tipo 2A, mientras que el método diagnóstico *in vitro* de la invención no identificó signos de un riesgo hemorrágico/VWD ya que las relaciones de la TEG estaban en el intervalo normal. Posteriormente, se realizaron pruebas de nuevo con una segunda muestra de los pacientes y en ese momento no mostró anomalías en el patrón del múltímero.

20 Ejemplo 5:

a) Control de la terapia *in vitro* (concentrado del VWF)

Se incubó sangre con citrato de un paciente con la VWD de tipo 3 con diferentes cantidades de haemate, un concentrado comercial del VWF para la terapia de sustitución. La mezcla se mezcló bien y se dividió en dos
25 alícuotas de 500 µL. Se añadieron 25 µL de ristocetina con una concentración de 15 mg mL⁻¹ a una parte de las alícuotas de sangre activada y ambas muestras se incubaron en un mezclador durante 10 min. Se añadieron 300 µL de ambas alícuotas a las copas de ensayo de la TEG de un analizador ROTEM® que contenían 20 µL de reactivo star-TEM para la recalcificación y 20 µL del reactivo exTEM. El factor tisular añadido desencadena la cascada de coagulación extrínseca. Se utilizó un analizador ROTEM® para registrar los trazados de la TEG al menos hasta alcanzar la amplitud máxima. Tal como se muestra en la figura 6, la relación está normalizada y no es
30 significativamente diferente entre pacientes sanos después de añadir Haemate *in vitro*.

b.) Control de la terapia *in vivo* (DDAVP)

En la VWD la terapia puede ser necesaria para aliviar un episodio hemorrágico o para prevenir un episodio hemorrágico. Por lo general, la mayoría de los individuos con el tipo 1 de la VWD son tratados eficazmente utilizando DDAVP (siglas en inglés de acetato de desmopresina), que actúa para liberar el VWF endógeno almacenado. Es
35 habitual llevar a cabo un experimento con DDAVP y a continuación monitorizar la respuesta mediante una posterior obtención de muestras sanguíneas y pruebas. Todos los pacientes tuvieron una relación elevada entre las amplitudes antes de la administración del DDAVP y el DDAVP fue capaz de normalizar la relación de la TEG $(\frac{[\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida}]}{[\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida}]}) \times 100$. El método es una herramienta simple y rápida para discriminar los que responden de los que no responden al DDAVP. La ventaja de este método es el tiempo de prueba entre cercano e inmediato obtenido. El resultado está disponible muy poco después de la obtención de muestras sanguíneas. Por el contrario, el resultado VWF:CB se obtiene, por lo general, algunos días después de la obtención de muestras sanguíneas. Los valores para la relación entre las amplitudes, el VWF:Ag y el VWF:RCo se muestran en la figura 7 para tres puntos temporales (antes, 30 min después y 180 min después de la administración del DDAVP). Esto muestra que también se puede utilizar *in vivo* el método diagnóstico *in vitro* de la invención para monitorizar el éxito de una intervención terapéutica con el DDAVP para reducir un riesgo hemorrágico debido a la VWD.

c.) Control de la terapia *in vivo* (concentrado del VWF).

Los pacientes con una deficiencia entre moderada y grave del factor VIII y del factor de von Willebrand normalmente requieren tratamiento. Proporcionar el VWF normal a través de la infusión de concentrados obtenidos a partir del plasma puede corregir la deficiencia del factor VIII y el VWF. Se realizaron ensayos de TEG con y sin una preincubación con ristocetina antes y después de la administración. El efecto de la sustitución del VWF se puede apreciar en el descenso significativo de la relación entre las amplitudes máximas en la prueba de TEG $(\frac{[\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida}]}{[\text{amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida}]}) \times 100$ tal como se muestra en la figura 8. En consecuencia, los autores obtienen un aumento en los valores de la línea base en plasma de VWF:Ag y actividad del VWF-cofactor de
55

ristocetina desde un 10% y un 11% respectivamente hasta un 139% y un 66% para ambas variables. Esto muestra que también se puede utilizar *in vivo* el método diagnóstico *in vitro* de la invención para monitorizar el éxito de una intervención terapéutica que sustituye el VWF para reducir un riesgo hemorrágico debido a la VWD.

Ejemplo 6:

- 5 Los autores evaluaron el rendimiento de este ensayo y su utilidad para el diagnóstico en el laboratorio de la VWD. En el estudio participaron 103 pacientes (58 mujeres, 45 hombres; edad mediana 11.9 ± 11.2). Se excluyeron del estudio los pacientes con trastornos hemofílicos preexistentes que pueden ser determinados por el ensayo INTEM. La clasificación de la VWD fue realizada por un laboratorio de referencia basándose en el VWF:Ag, vWF:CB y patrón del multímero del VWF. En la figura 9 y 10 se muestran, para los tres subgrupos, los resultados de las relaciones entre las amplitudes máximas ((amplitud máxima en una muestra sanguínea procedente de un donante con ristocetina añadida)/(amplitud máxima en una muestra sanguínea sin ristocetina añadida)]*100).

Clasificación		Número
VWD		21
	Tipo 3	1
	Tipo 2A	4
	Tipo 2B	2
	Tipo 1	3
	Fenotipo moderado de tipo 1	11
	Equívoca (no VWD pero en el límite)	17
	Normal (no VWD)	61
Otra	Defecto de la función trombocítica no clasificado	1
	Hemorragia abdominal	1
	Enfermedad por defecto del almacenamiento de trombocitos	1
	Disfibrinogenemia	
Total		103

Tal como se representa en las figuras 9 y 10, el resultado fue el siguiente:

- a) relación de la TEG < 15%
- 15 → 56 muestras procedentes de individuos sanos normales (xyz de ellos con un resultado diagnóstico de VWD "equívoca")
- 1 muestra procedente de un paciente con la vWD de tipo 1 (fenotipo moderado)
- b) relación de la TEG ≥ 15%
- 1 muestra procedente de un paciente con la VWD de tipo 3
- 20 → 4 muestras procedentes de pacientes con la VWD de tipo 2A
- 2 muestras procedentes de pacientes con la VWD de tipo 2B
- 3 muestras procedentes de pacientes con la VWD de tipo 1
- 10 muestras procedentes de pacientes con la VWD de tipo 1 (fenotipo moderado)
- 26 muestras procedentes de individuos sin la VWD

De acuerdo con un valor de corte de un 15% para la relación de las amplitudes, la sensibilidad para detectar la VWD fue de un 95% ($[(\text{número de verdaderos positivos}/(\text{número de verdaderos positivos} + \text{número de falsos negativos}))]: 20/21 = 95.2\%$), la especificidad para la VWD fue de un 68% ($[(\text{número de verdaderos negativos}/(\text{número de verdaderos negativos} + \text{número de falsos positivos}))]: 56/82 = 68.3\%$).

5 Sin embargo, entre los 26 individuos que presentaban una relación de la TEG $\geq 15\%$ pero que no fueron clasificados como VWD por el laboratorio de referencia, casi la mitad tenían antecedentes clínicos que indicaban otros trastornos hemorrágicos no caracterizados. Hasta el momento, los siguientes trastornos hemorrágicos pudieron asignarse a:

→ un paciente tiene un defecto de la función trombocítica no clasificado con fuerte hemorragia gastrointestinal,

10 → un paciente tiene fuerte hemorragia gastrointestinal provocada por un síndrome linfoproliferativo,

→ un paciente tiene una enfermedad por defecto del almacenamiento de trombocitos,

→ un paciente tiene una disfibrinogenemia,

→ cinco pacientes se clasifican como VWD equívoca

→ dos pacientes tienen episodios hemorrágicos repetidos, epistaxis y tiempos hemorrágicos prolongados

15 → tres individuos tienen antecedentes familiares de graves episodios hemorrágicos

De manera que se puede asumir que la especificidad y sensibilidad para los trastornos hemorrágicos es mucho más elevada.

20 Con respecto al diagnóstico de una diátesis hemorrágica, la sensibilidad parece ser de al menos un 95% (ya que el único paciente con la VWD de tipo xyz que no se detectó puede que no hubiera mostrado un mayor riesgo hemorrágico al ser examinado adicionalmente) y una especificidad potencial de un 82% ($56/68 = 82.3\%$). Asimismo, la especificidad real podría ser incluso superior si, tras un examen adicional, resultara que los 15 individuos restantes que son "falsos positivos", tienen un mayor riesgo hemorrágico.

25 Por lo tanto, el método diagnóstico *in vitro* de la invención es adecuado para detectar no solamente riesgos hemorrágicos asociados con la VWD o enfermedades trombocíticas que afectan a la interacción del VWF con los trombocitos, sino que es una prueba general adecuada para detectar riesgos hemorrágicos.

REIVINDICACIONES

1. El método diagnóstico *in vitro* para determinar defectos cuantitativos o cualitativos del factor de von Willebrand **caracterizado por:**
- 5 a) utilizar una muestra obtenida a partir de un individuo humano o un animal que comprende un fluido corporal que comprende trombocitos y factores hemostáticos,
- b) incubar al menos una parte de la muestra con un activador de la agregación de trombocitos, donde el activador de la agregación de trombocitos es un compuesto que es capaz de inducir la activación, agregación y aglutinación de trombocitos dependientes del VWF en un fluido obtenido a partir del cuerpo humano que contiene trombocitos y el VWF provocando la unión del VWF al receptor del VWF en los trombocitos,
- 10 c) inducir la coagulación en la parte de la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos,
- d) medir el cambio viscoelástico que ocurre después de inducir la coagulación en la parte de la muestra que se ha incubado con un activador de la agregación de trombocitos en un tromboelastógrafo, y
- 15 e) comparar la cantidad de cambio viscoelástico determinado en el paso (d) con un valor de referencia,
- donde el valor de referencia se obtiene:
- i) dividiendo la muestra original del donante obtenida en el paso (a) en al menos dos muestras u obtener en el paso (a) al menos dos muestras a partir de un donante donde en al menos una muestra únicamente se llevan a cabo el paso (a) y los pasos (c) a (e) y se omite el paso (b) y donde la cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra en la cual se ha omitido el paso (b) es el valor de referencia; o
- 20 ii) aplicando un método que comprende el paso (a) y los pasos (c) a (e) a una muestra procedente de un donante sano o a varias muestras procedentes de donantes sanos sin un mayor riesgo hemorrágico, donde la cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra o en las muestras en las que se omitió el paso (b) es el valor de referencia; o
- 25 iii) aplicando un método que comprende los pasos (a) a (e) a una muestra procedente de un donante sano o a varias muestras procedentes de donantes sanos sin un mayor riesgo hemorrágico donde la cantidad de cambio viscoelástico medida en la muestra o en las muestras es el valor de referencia.
2. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fluido corporal es sangre entera, sangre anticoagulada o plasma rico en trombocitos.
- 30 3. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde el valor de referencia obtenido en el apartado (ii) o (iii) alternativo de la reivindicación 1 es un valor promedio de las cantidades de cambio viscoelástico medidas en varias muestras obtenidas a partir de donantes sanos.
4. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde se añade un activador de la coagulación.
- 35 5. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde se añade un activador de la coagulación antes del paso (b) o después del paso (b) pero antes de inducir la coagulación en el paso (c).
6. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde se mide el cambio viscoelástico determinando cualquiera de los parámetros de la tromboelastografía.
- 40 7. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 6, donde el parámetro de la tromboelastografía es la amplitud máxima.
8. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, donde el activador de la agregación de trombocitos se selecciona a partir del grupo que comprende la ristocetina y la botrocetina.
9. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8, donde el activador de la agregación de trombocitos es la ristocetina.
- 45 10. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, donde la concentración de ristocetina está comprendida entre 0.1 mg/mL y 1.5 mg/mL.
11. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 para predecir el riesgo hemorrágico de

un paciente antes de la cirugía o durante la terapia.

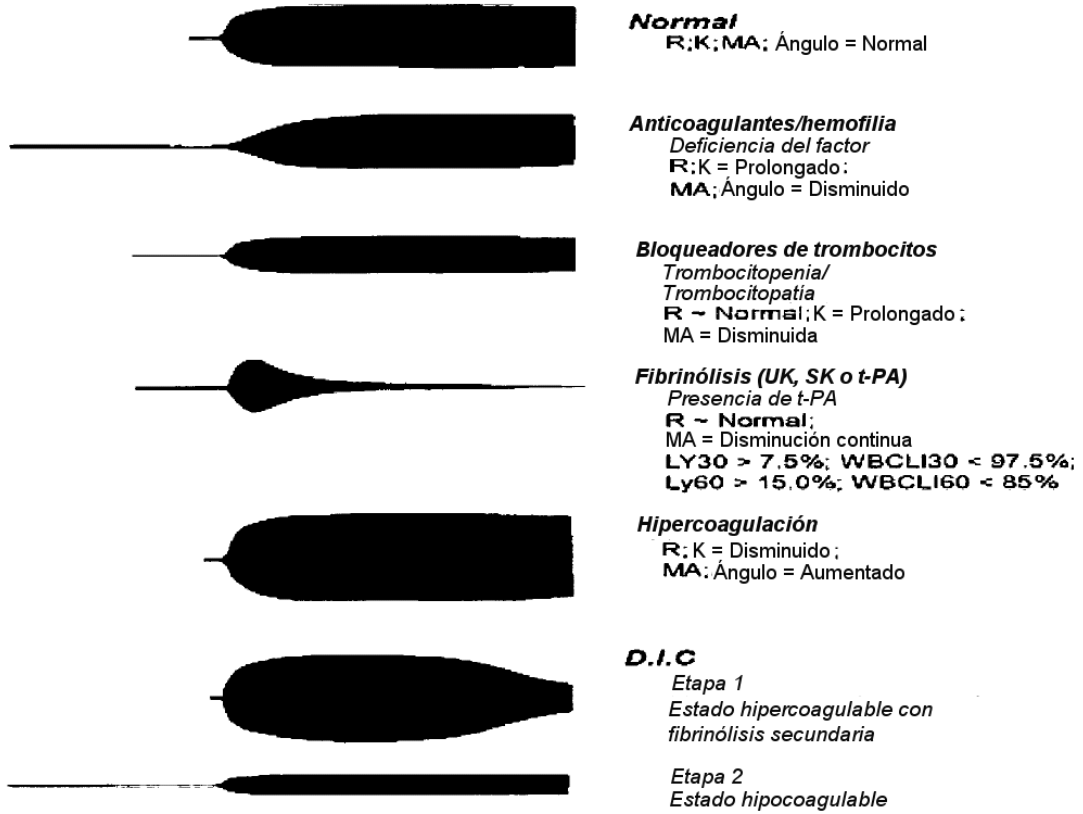
12. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, donde la muestra del fluido corporal es, como máximo, de 105 µL por prueba.

5 13. El método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, donde un valor del (cambio viscoelástico en una muestra de un fluido corporal procedente de un donante con activador de la agregación de trombocitos añadido)/(cambio viscoelástico en una muestra del mismo fluido corporal sin activador de la activación de trombocitos añadido) igual o superior a 0.15 se interpreta que es un indicador de un riesgo hemorrágico.

14. El uso del método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 para el control de la terapia, donde la terapia comprende la administración del DDAVP.

10 15. El uso del método diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 para el control de la terapia, donde la terapia comprende la administración de un concentrado del VWF.

Figura 1:



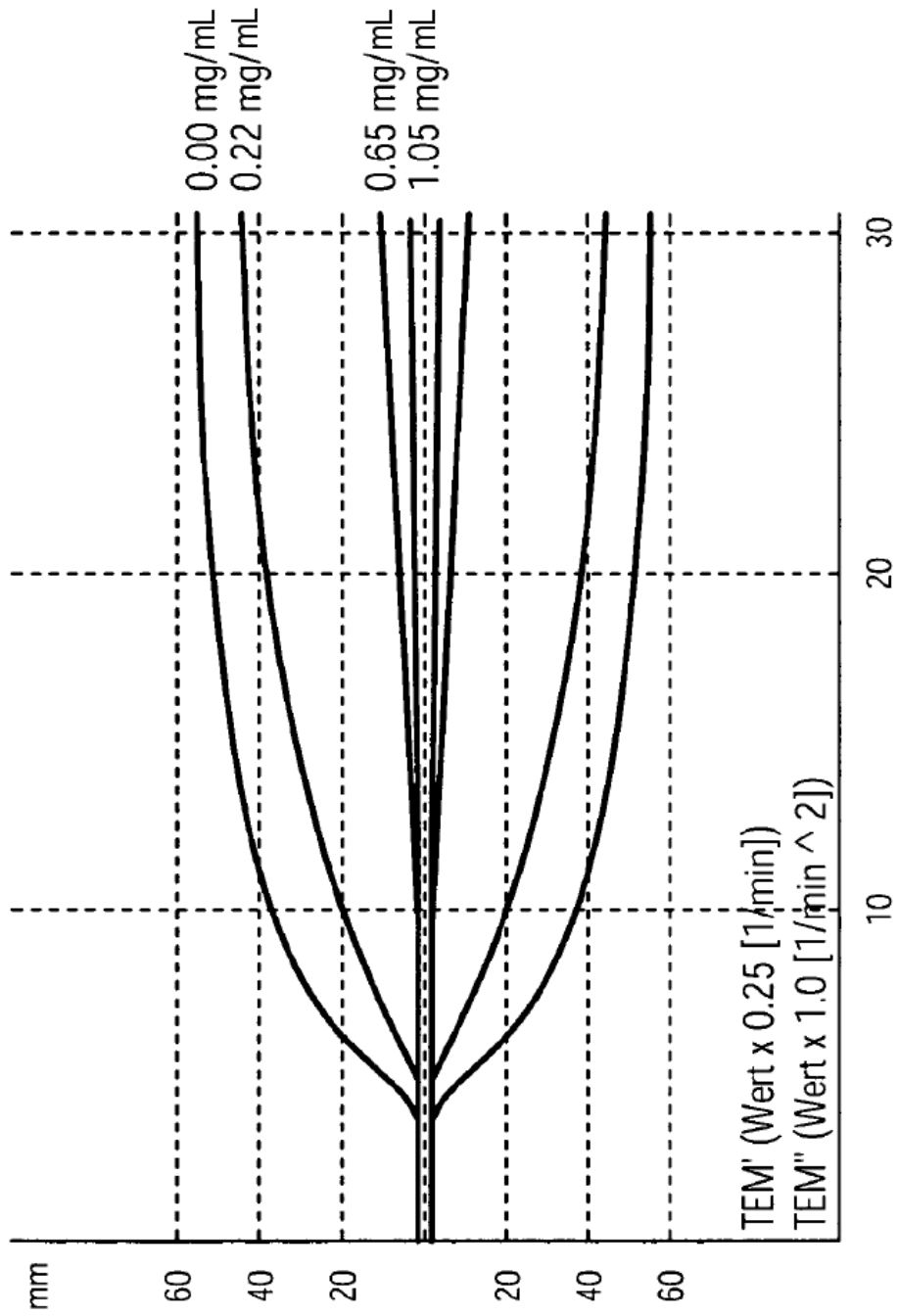
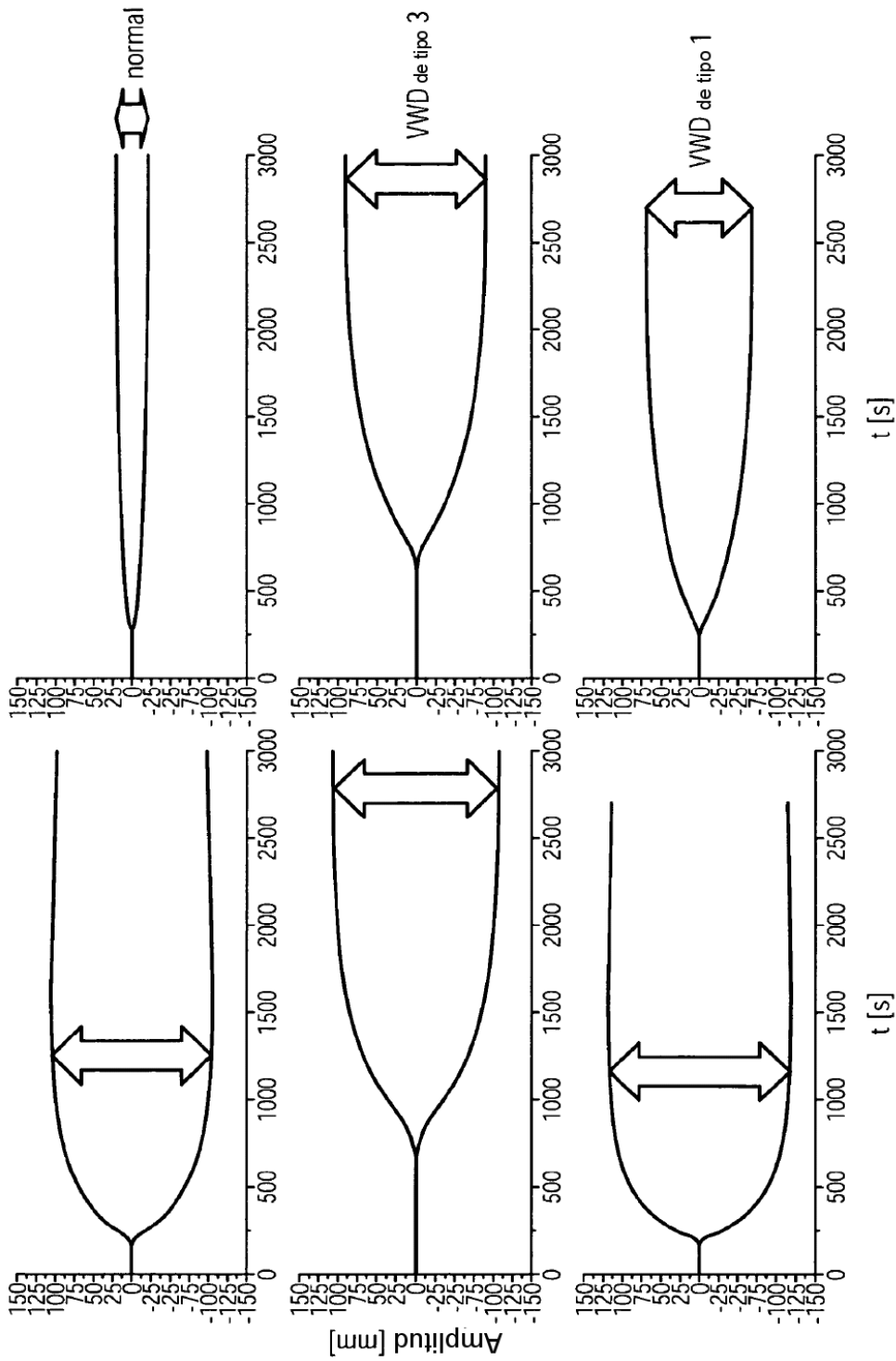


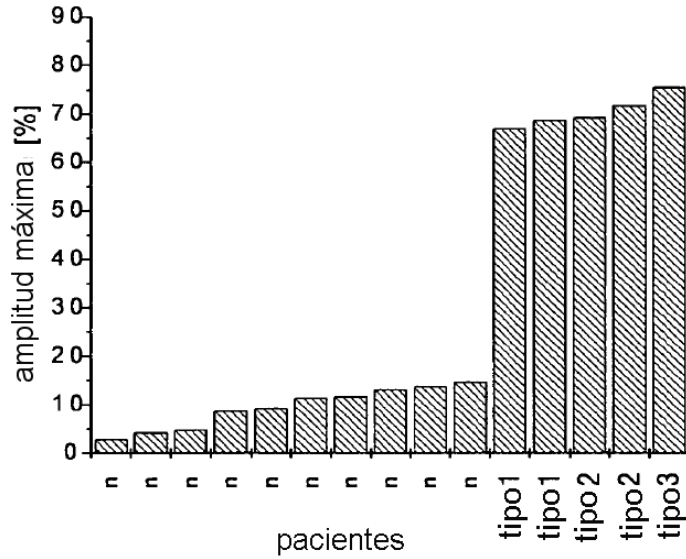
Figura 2:



con preincubación con ristocetina

sin preincubación

Concentración de ristocetina 1.05 mg/mL



Concentración de ristocetina 0.71 mg/m

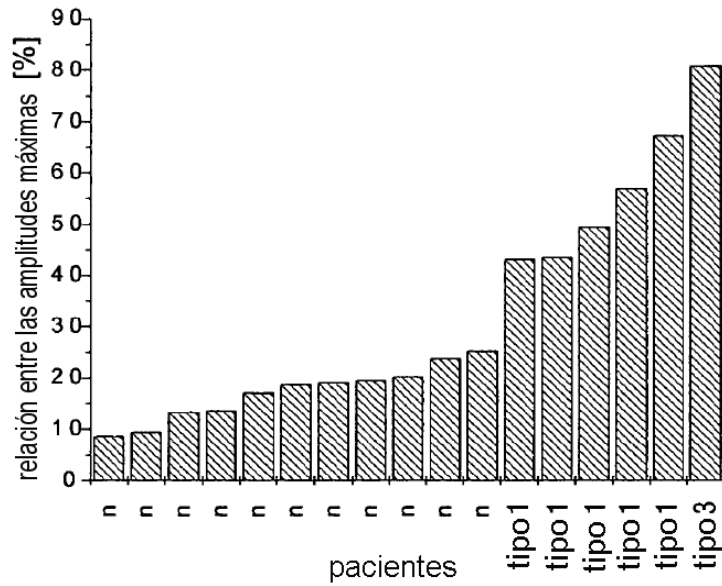
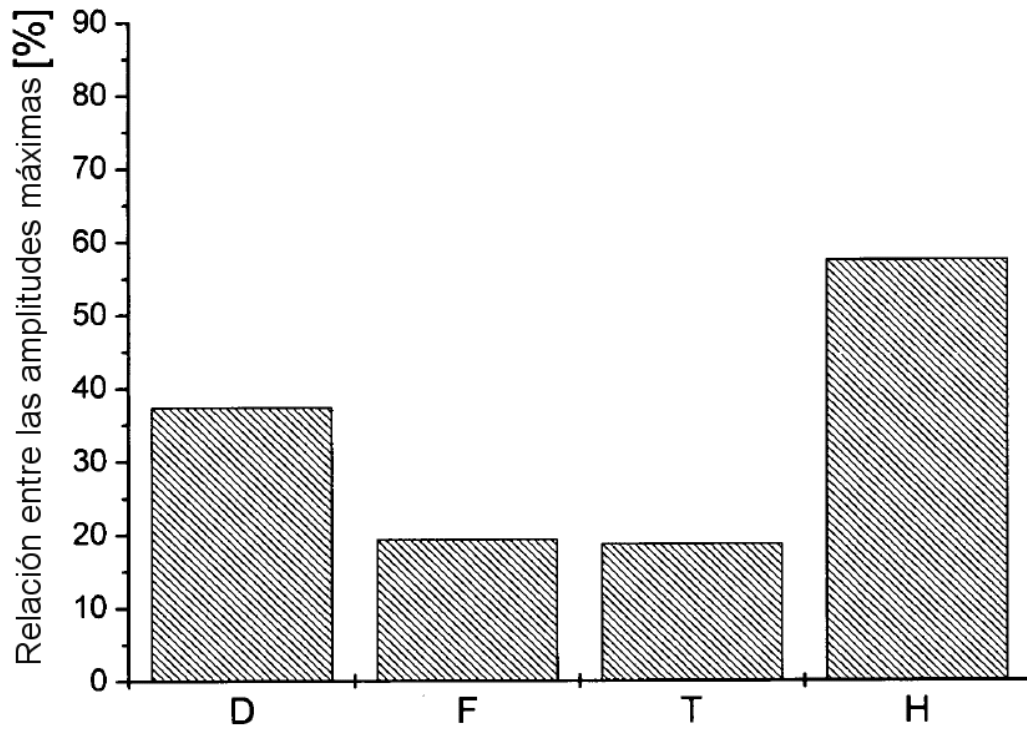


Figura 4:

Figura 5



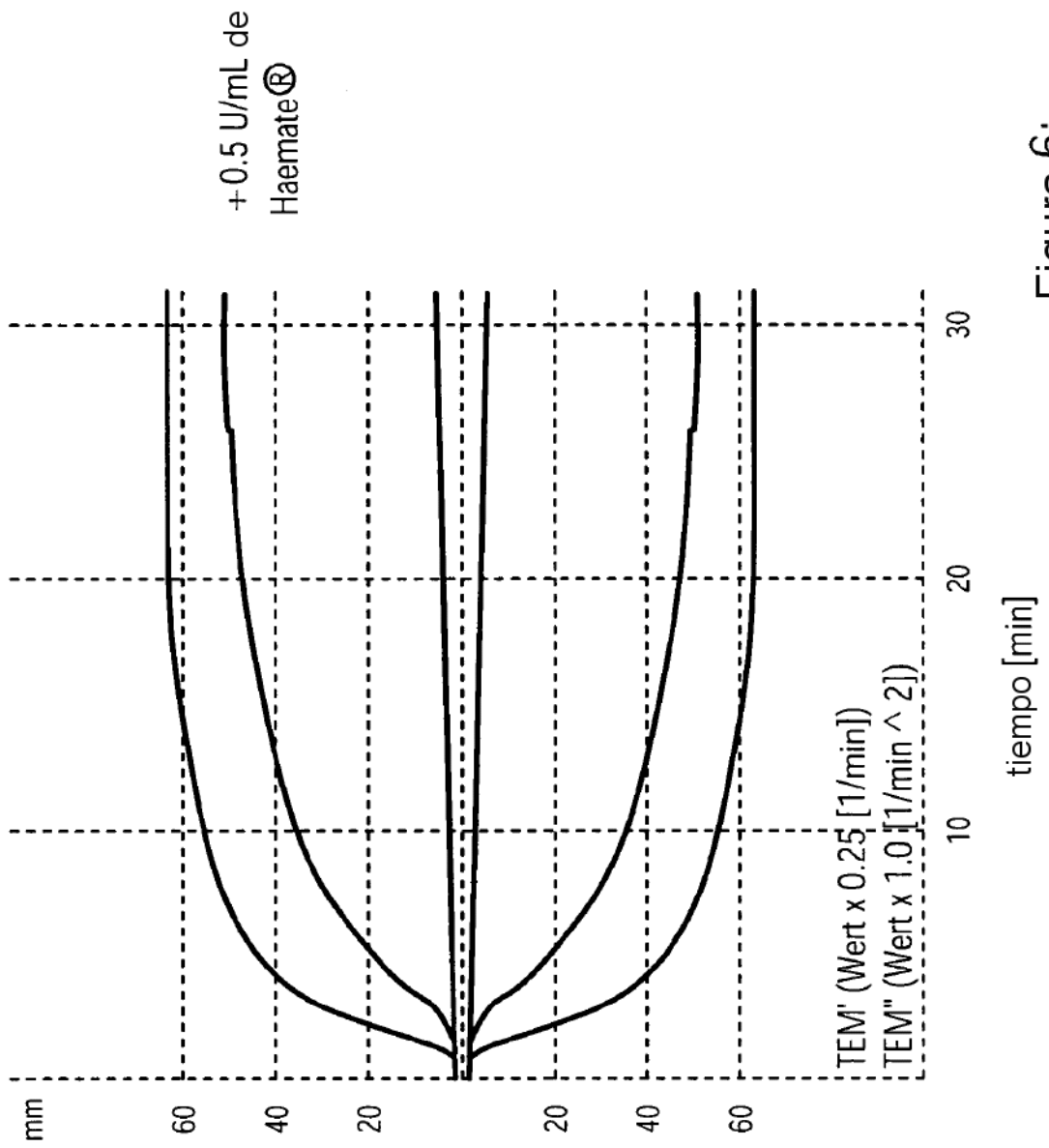
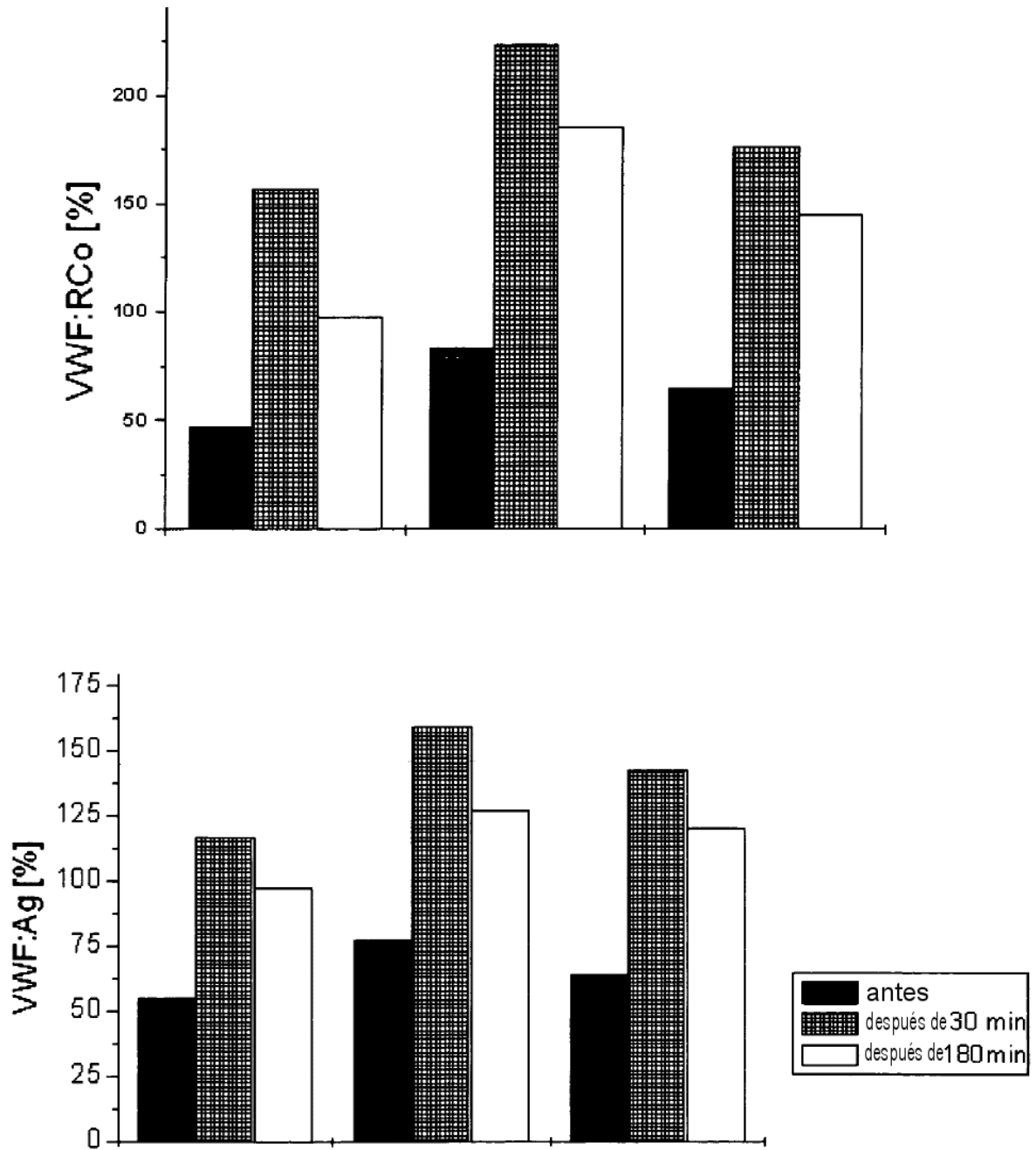


Figura 6:

Figura 7



Continuación de la Figura 7

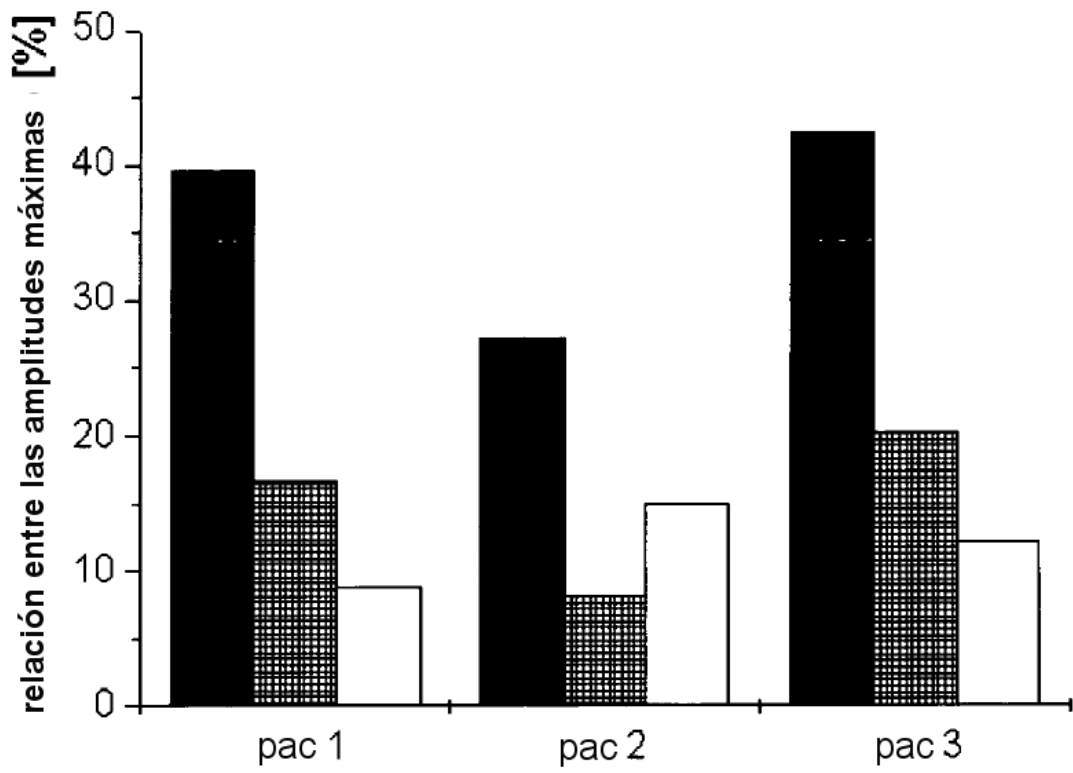


Figura 8

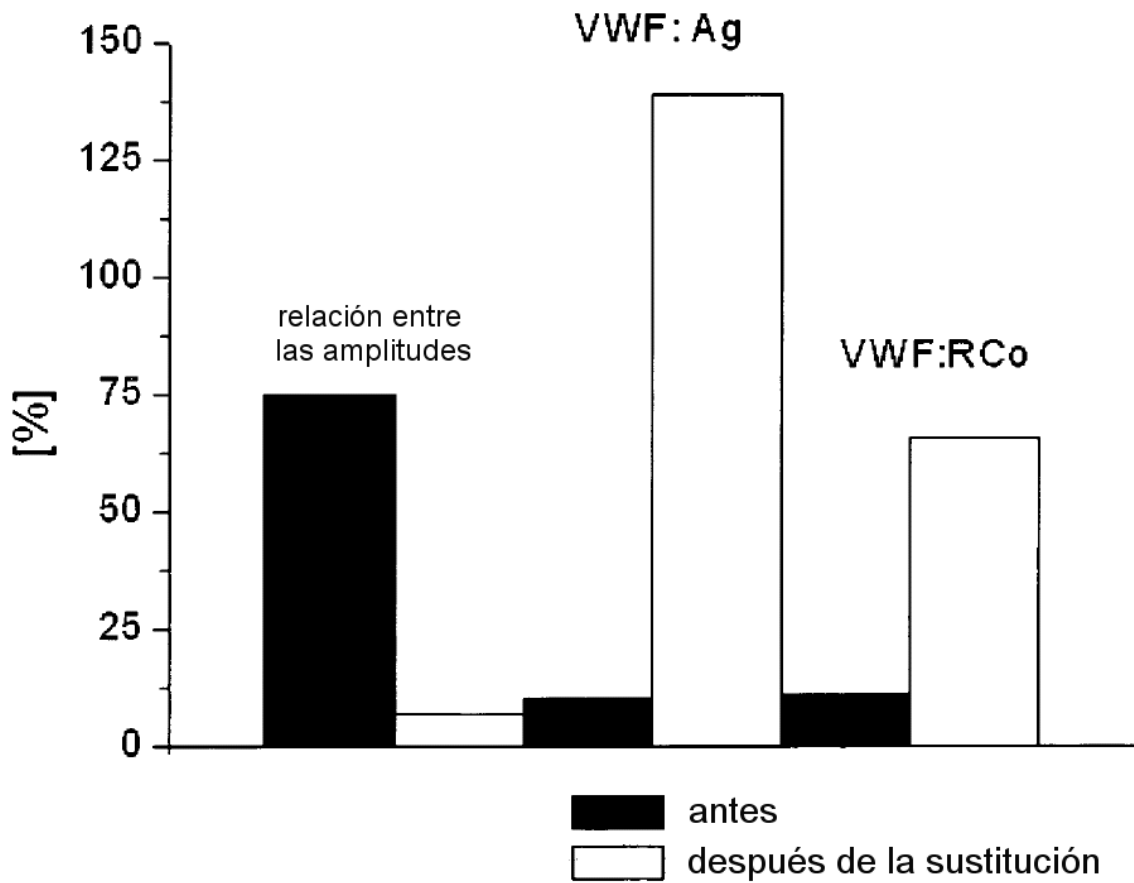


Figura 9

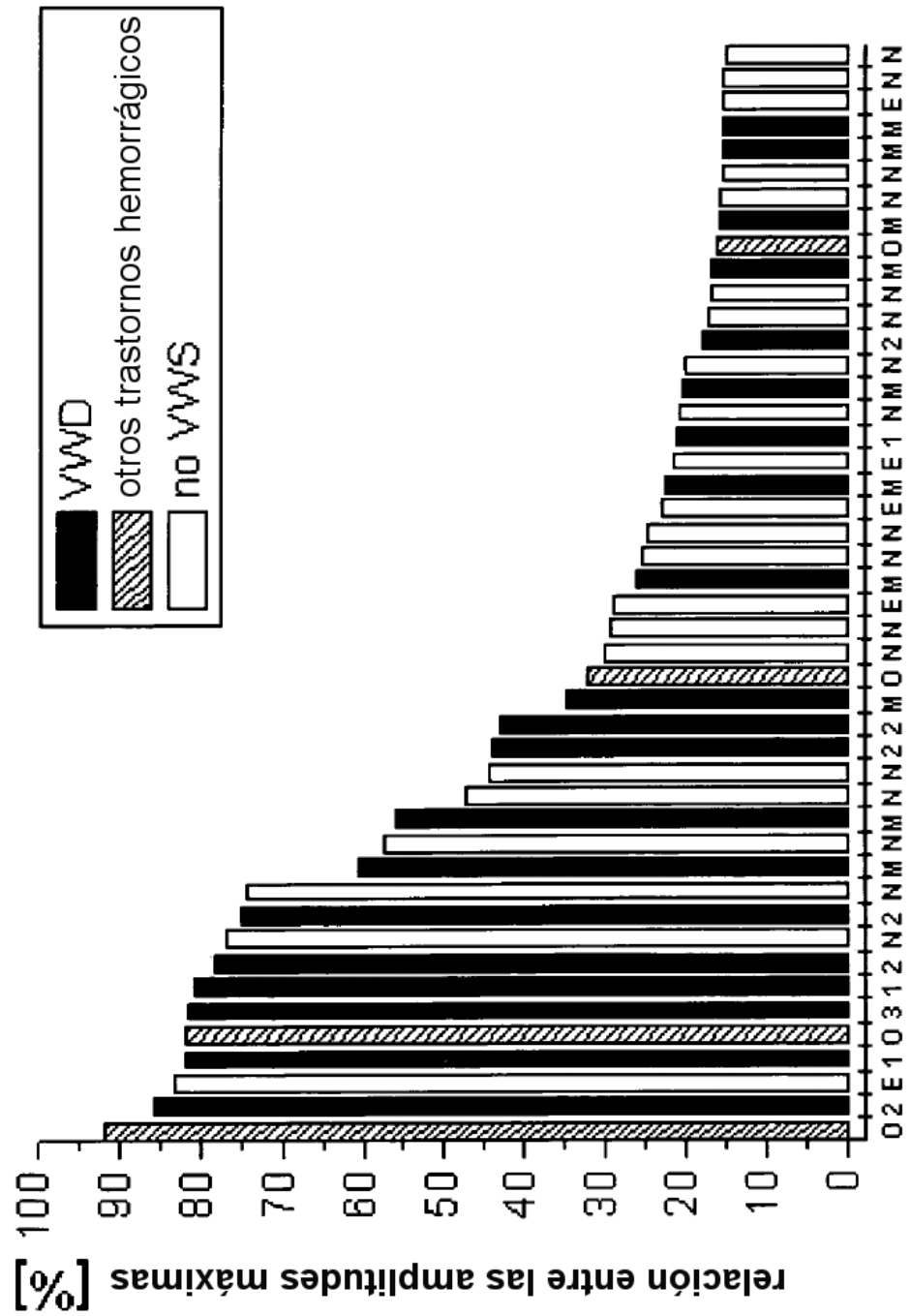


Figura 10

