

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 760**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06750226 .0**
96 Fecha de presentación: **14.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1877786**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y SISTEMA PARA LA ESTABILIZACIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNIC
PARA SU USO EN UN ENSAYO DE FUNCIÓN DE PLAQUETAS.**

30 Prioridad:
28.04.2005 US 119360

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

73 Titular/es:
**ACCUMETRICS, INC.
3985-B SORRENTO VALLEY ROAD
SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:
**MCHUGH, Sean y
DURBIN, Dennis**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 372 760 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 y sistema para la estabilización de ácido araquidónico para su uso en un ensayo de función plaquetaria

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención:

10 **[0001]** La presente invención se refiere a métodos y sistemas para estabilizar el ácido araquidónico (AA), y más particularmente a métodos y sistemas para estabilizar el AA en un ensayo de función plaquetaria de un solo uso.

Descripción de la técnica relacionada:

15 **[0002]** El papel de las plaquetas en la fisiología de mamíferos es extraordinariamente diverso, pero su papel primario está en la promoción de la hemostasia. En muchas situaciones, se desea una evaluación de la capacidad de la sangre para coagular, un parámetro que está frecuentemente controlado por la capacidad de las plaquetas para adherirse y/o agregarse. Por lo tanto, es de interés la evaluación de las funciones adhesivas de las plaquetas. Por ejemplo, las cuestiones de interés incluyen si administrar fármacos que bloquearán, o promoverán, la formación de coágulos, o detectar deficiencias en la función plaquetaria antes de procedimientos quirúrgicos. También es de
20 interés evaluar la eficacia de un inhibidor de plaquetas que esté siendo ensayado como un nuevo fármaco o se esté usando como tratamiento químico autorizado en un paciente.

25 **[0003]** La agregación de plaquetas desempeña un papel clave en la patogénesis de la trombosis y la arteriopatía coronaria aguda. Las pruebas sugieren que existe una variabilidad significativa de la función plaquetaria en la respuesta a diversos agentes antiplaquetarios. En particular, la aspirina se usa ampliamente por sus efectos antiplaquetarios en pacientes con síndromes coronarios agudos (ACS). Los beneficios clínicos de la aspirina en los ACS se deben en parte a su capacidad para inhibir el tromboxano A₂ (TXA₂), que se sabe que causa la agregación de plaquetas, por la acetilación irreversible de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1).

30 **[0004]** La agregación de plaquetas es una expresión usada para describir la unión de plaquetas entre sí. La agregometría de plaquetas *in vitro* es el método de laboratorio usado para evaluar la capacidad *in vivo* de las plaquetas para formar los agregados que conducen a un tapón hemostático primario. En esta técnica, una muestra de sangre completa tratada con anticoagulante se centrifuga en múltiples condiciones para crear tanto una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP) como de plasma pobre en plaquetas (PPP). Después se añade un agente de
35 agregación al PRP y la agregación de plaquetas se controla ópticamente mientras que en paralelo a esto se realiza una medición óptica separada usando la muestra de PPP. El porcentaje de agregación se determina después mediante el uso del canal de PPP como el nivel de referencia de agregación del 100% para comparar con el canal de PRP.

40 **[0005]** Helena Laboratories (Beaumont, TX), un fabricante de sistemas de agregometría plaquetaria para uso de laboratorio proporciona bibliografía educativa que sugiere el agente de agregación apropiado depende del propósito del ensayo. Para evaluar los efectos de la aspirina sobre la función plaquetaria, Helena Laboratories expone que "El ensayo de agregación de plaquetas de ácido araquidónico es la única forma práctica de controlar los efectos de la terapia con aspirina, usada ampliamente en la actualidad para prevenir ictus y ataques al corazón". Helena
45 Laboratories, Evaluation of Platelet Function Wall Chart 586-25. El ácido araquidónico es un ácido graso presente en los gránulos y membranas de las plaquetas humanas. Marcus AJ: Platelet lipids. En Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice, pág. 472. JB Lippencott Company, Philadelphia 1982. Se libera a partir de fosfolípidos y, en presencia de la enzima ciclooxigenasa uno (COX-1), incorpora oxígeno para formar el endoperoxido prostaglandina G₂ (PGG₂). La PGG₂ se transforma
50 después rápidamente en prostaglandina H₂ (PGH₂), que a su vez se convierte en tromboxano A₂, un potente inductor de la agregación de plaquetas. La ingestión de aspirina o compuestos que contienen aspirina inhibe el consumo de oxígeno mediado por COX-1, impidiendo de este modo todos los acontecimientos posteriores que conducen a la agregación plaquetaria. Bye A, Lewis Y, O'Grady J: Effect of a single oral dose of aspirin on the platelet aggregation response to arachidonic acid. Br J Clin Pharmacol 7: 283, 1979.

55 **[0006]** La adición *in vitro* de ácido araquidónico a plasma rico en plaquetas normal da como resultado una explosión en el consumo de oxígeno, la formación de tromboxano y la agregación de plaquetas. Moncada S, Vane JR: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. N Eng J Med 300: 1142, 1979. Sin embargo, en presencia de aspirina o compuestos que contienen aspirina, estas reacciones están
60 ausentes. Ingerman CM, Smith JB, Shipiro S, Sedar A, Silver A, Silver MJ: Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency, Blood 52: 332, 1978.

[0007] La exposición con el uso de ácido araquidónico en entornos clínicos es la naturaleza relativamente inestable del compuesto. Cuando se expone a oxígeno, el ácido araquidónico experimenta un proceso denominado
65 autooxidación. La autooxidación se define generalmente como una reacción química que habitualmente tiene lugar a temperatura ambiente entre el oxígeno atmosférico y un compuesto orgánico. Son ejemplos comunes de los

fenómenos de autooxidación el pardeamiento de la fruta, el aherrumbrado del metal y la degeneración de productos de goma. La autooxidación causa que el ácido araquidónico se vuelva amarillo y se deteriore rápidamente. En un uso de laboratorio típico, el ácido araquidónico se almacena a -20°C en ampollas inertes selladas y, una vez descongelado, se recomienda usarlo en las 24 horas siguientes. Hojas de Datos de Sigma-Aldrich A9673 y A8798.

5 Como alternativa, algunos fabricantes liofilizan una versión basada en sal del ácido araquidónico, pero de nuevo el material debe almacenarse en una ampolla inerte sellada a -20°C y usarse inmediatamente tras su apertura. En el entorno clínico existe con frecuencia poca antelación de la necesidad de ejecutar un ensayo particular, y la necesidad de gestionar la cantidad de material a descongelar, y el posterior uso del material de una forma oportuna es engorroso y además requiere mucho tiempo.

10

[0008] Otro aspecto de la autooxidación del ácido araquidónico de importancia particular para su uso como activador de plaquetas es que la autooxidación *ex vivo* del ácido araquidónico no crea necesariamente los mismos subproductos que la oxidación *in vivo*, y en algunos casos puede producir subproductos estables que imiten al TXA2. El uso de ácido araquidónico que se hubiera degradado de esta forma en un ensayo para evaluar los efectos de la aspirina indicaría falsamente que la aspirina no estaba teniendo efecto sobre la agregación de plaquetas.

15

[0009] Los fenómenos de autooxidación podrían prevenirse mediante la exclusión total de oxígeno u otras sustancias oxidantes, pero en general esto no es práctico. En su lugar, lo que se hace más típicamente es utilizar inhibidores que disminuyan la velocidad de reacción o prolonguen el periodo de inducción. Sin embargo, una prevención completa de la autooxidación es improbable. Las sustancias que pueden suprimir la autooxidación se denominan inhibidores o antioxidantes. Los inhibidores preventivos disminuyen la velocidad de autooxidación suprimiendo la velocidad de las reacciones de iniciación. Los antioxidantes es su verdadero sentido son sustancias que pueden inhibir las etapas de propagación; es decir, interrumpen las reacciones de la cadena de autooxidación porque después de ceder su electrón están todavía en una configuración estable. Los antioxidantes se usan comúnmente en la conservación de alimentos, para evitar que los alimentos se enrancien, se pardeen o desarrollen manchas negras. Los antioxidantes también minimizan los daños a algunos aminoácidos esenciales y la pérdida de algunas vitaminas. Los dos tipos comunes de antioxidantes usados en los alimentos son ácidos y compuestos fenólicos. Los ejemplos de antioxidantes ácidos son ácidos ascórbico y cítrico, mientras que los compuestos antioxidantes fenólicos incluyen BHA, BHT, TBHQ, Tocoferoles, Lecitina, THBP, Goma y Glicina.

20

[0010] Debido a las dificultades con el almacenamiento y la manipulación, ningún analizador clínico de la función plaquetaria utiliza actualmente ácido araquidónico para medir la respuesta de las plaquetas a la aspirina. En su lugar, sistemas como el Dade Behring PFA-100® o el Plateletworks® usan una combinación de activadores de plaquetas tales como difosfato de adenosina (ADP), colágeno y epinefrina. Sin embargo, estos sistemas han demostrado escasa sensibilidad y especificidad para la detección de una función plaquetaria alterada por aspirina ya que sus agonistas de activación no son específicos para la ruta a la que se dirige la aspirina. El Ensayo de Aspirina *VerifyNow™* de Accumetrics inicial usaba propil galato catiónico (cPG) como agonista de plaquetas. El cPG activa a las plaquetas causando la liberación del ácido araquidónico unido a plaquetas de la capa fosfolipídica, y se ha demostrado que proporciona una activación sensible y específica de las plaquetas a lo largo de la ruta a la que se dirige la aspirina. Steiskal, et al, Application of Cationic Propyl Gallate as Inducer of Thrombocyte Aggregation For Evaluation of Effectiveness of Antiaggregation Therapy. Sin embargo, la limitación del cPG es que cuando se usa en sangre completa frente a PRP la activación de plaquetas es menos uniforme, presumiblemente debido al efecto de los eritrocitos sobre la carga catiónica.

25

[0011] Recientemente se ha desarrollado un ensayo rápido de la función plaquetaria y se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.763.199. El ensayo determina el bloqueo del receptor de glicoproteína (GP)IIb/IIIa en sangre completa no diluida. La aglutinación de pequeñas perlas poliméricas recubiertas con un ligando de GPIIb/IIIa tal como fibrinógeno se obtiene como resultado cuando las perlas se ponen en contacto con sangre completa que contiene plaquetas con receptores de GPIIb/IIIa activados que no están bloqueados. La incapacidad para aglutinar indica la incapacidad de los receptores de GPIIb/IIIa para activarse y/o el bloqueo de los receptores de GPIIb/IIIa. En una realización preferida, la adición de un activador de plaquetas como ácido araquidónico da como resultado un ensayo que es lo bastante rápido y conveniente para realizarse a la cabecera del paciente y eso da como resultado la aglutinación de las pequeñas perlas poliméricas en un periodo de tiempo conocido conveniente si los receptores de activación no están bloqueados. El ensayo incluye la capacidad de transferir la sangre que se va a ensayar desde un recipiente de recogida hasta un dispositivo de ensayo sin abrir el recipiente de recogida.

30

[0012] Existe la necesidad de un método para determinar rápidamente el nivel de inhibición de plaquetas en sangre completa, debido al uso de aspirina, con un dispositivo basado en araquidónico de un solo uso que puede almacenarse a temperatura ambiente durante muchos meses.

35

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0013] Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos y sistemas para determinar rápidamente el nivel de inhibición de plaquetas en sangre completa debido al uso de aspirina con un dispositivo de ensayo basado en araquidónico de un solo uso que puede almacenarse a temperatura ambiente durante muchos meses.

40

[0014] Este y otros objetos de la presente invención se consiguen en el método y los dispositivos de ensayo de un solo uso que se reivindican. Se utiliza un reactivo de ensayo liofilizado que contiene ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al máximo las plaquetas. Un antioxidante dentro del mismo reactivo de ensayo liofilizado reduce la velocidad de oxidación del ácido araquidónico pero no interfiere con la función plaquetaria. Un agente de absorción de oxígeno con capacidad suficiente dentro del envase del dispositivo de ensayo de un solo uso crea un entorno inerte en un periodo de tiempo corto después de que se selle el envase.

[0015] En una realización de la presente invención, un dispositivo de ensayo para medir la función plaquetaria tiene un alojamiento con una pluralidad de canales y un orificio común de introducción de la muestra de sangre acoplado a cada uno de los canales de la pluralidad de canales. Se incluyen una pluralidad de reactivos. Cada reactivo está situado en un canal separado. La pluralidad de reactivos incluye un reactivo de ensayo liofilizado que contiene ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al máximo las plaquetas, y un antioxidante dentro de un mismo reactivo de ensayo liofilizado que reduce la velocidad de oxidación del ácido araquidónico y no interfiere con la función plaquetaria.

[0016] En otra realización de la presente invención, se proporciona un dispositivo de ensayo para medir la función plaquetaria e incluye un reactivo de ensayo liofilizado que contiene ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al máximo las plaquetas. Un antioxidante dentro de un mismo reactivo de ensayo liofilizado reduce la velocidad de oxidación del ácido araquidónico y no interfiere con la función plaquetaria. Se proporciona un agente de absorción de oxígeno con una capacidad suficiente dentro de un envase de dispositivo de ensayo. El envase crea un entorno inerte en un periodo de tiempo corto del dispositivo de ensayo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0017] En diversas realizaciones de la presente invención, se utiliza una composición de ácido araquidónico como activador en la medición de la inhibición de la agregación de plaquetas por antagonistas de la ciclooxigenasa-1 (COX-1), en concreto aspirina, en muestras de sangre completa. Por consiguiente, las composiciones mencionadas anteriormente pueden emplearse para determinar la eficacia de la terapia antiplaquetaria que implica el tratamiento de pacientes con aspirina. Las composiciones anteriores pueden emplearse junto con partículas recubiertas con un ligando de receptor de GPIIb/IIIa y cualquier otro reactivo necesario para realizar un ensayo para determinar la eficacia de inhibidores de la COX-1 tales como aspirina.

[0018] Puede usarse una composición de reactivo liofilizado que comprende la composición de activador mencionada anteriormente y partículas. En una realización, un volumen medido de una muestra que se va a medir, tal como sangre completa, se mezcla mecánicamente con el reactivo liofilizado. Se controla un cambio en la transmisión de luz y se calcula el índice de actividad de plaquetas. En una realización, una muestra de sangre completa se combina en una cubeta o en un cartucho unificado con el reactivo liofilizado mencionado anteriormente. Puede emplearse un aparato para llevar a cabo el ensayo. El aparato puede incluir un pocillo para recibir la muestra, en el que el pocillo contiene el reactivo liofilizado y otros reactivos para realizar el ensayo. Los reactivos adicionales pueden ser diversos tampones y/o estabilizantes de la liofilización.

[0019] En una realización, la muestra se ha visto afectada por un antagonista del ácido araquidónico (AA). Por ejemplo, la muestra puede ser de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. En una realización de la presente invención, se proporciona una combinación en un medio de ensayo en la que la combinación es la muestra y una composición de AA con un estabilizante antioxidante, incluyendo pero sin limitación ácido ascórbico. La concentración final de AA puede ser de 0,5 a 10 mM, preferentemente, de 0,75 a 2 mM y la concentración final de ácido ascórbico puede ser de 1 a 30 mM, preferentemente de 5 a 15 mM.

[0020] Puede utilizarse un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que puede dar como resultado la aglutinación específica de plaquetas, es decir, la aglutinación de plaquetas por la interacción específica entre un receptor en las plaquetas y el compuesto en las partículas. Los compuestos adecuados incluyen, a modo de ilustración y no como limitación, anticuerpos contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa, que pueden ser una molécula orgánica pequeña, un polipéptido, proteína, anticuerpo monoclonal o ácido nucleico que se una a, forme complejos con o interaccione con receptores de GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas. La agregación mediada por plaquetas de las partículas se obtiene como resultado cuando los receptores de GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas se unen, forman complejos o interaccionan de otro modo con los ligandos del receptor de GPIIb/IIIa en las partículas. Los ligandos de GPIIb/IIIa adecuados incluyen fibrinógeno, el anticuerpo monoclonal 10E5 (Coller, et al., J. Clin. Invest. 72: 325 (1983)), el anticuerpo monoclonal c7E3 (The EPIC Investigators, N.E. Journal of Med., 330: 956 (1994)), el factor de von Willebrand, fibronectina, vitronectina y otros ligandos que tienen una secuencia de arginina glicina-ácido aspártico (RGD) u otros péptidos o peptidomiméticos que imiten esta secuencia (Cook, et al., Drugs of the Future 19: 135 (1994)). Otros compuestos de interés incluyen inhibidores de trombina tales como heparina de bajo peso molecular.

[0021] Las partículas a las que se une el compuesto son de al menos aproximadamente 0,1 micrómetros y de no más de aproximadamente 20 micrómetros. En una realización, las partículas son de aproximadamente 0,1

micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. En otra realización, las partículas son de al menos aproximadamente 1 micrómetro y de menos de aproximadamente 8 micrómetros. Las partículas pueden tener prácticamente cualquier forma, pero generalmente son esféricas con diámetros uniformes. Las partículas pueden tener cualquier densidad, y en una realización una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente de 5 aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,5 g/ml. Las partículas pueden tener o no una carga en la superficie, positiva o negativa, preferentemente negativa. Las partículas están funcionalizadas o pueden funcionalizarse para unirse o enlazarse covalentemente con dichos miembros en su superficie, directa o indirectamente.

[0022] Las partículas pueden ser sólidas (por ejemplo, compuestas por polímeros orgánicos e inorgánicos o látex), 10 gotas de aceite (por ejemplo, hidrocarburo, fluorocarburo, fluido de silicio), o vesículas (por ejemplo, sintéticas tales como fosfolípidos o naturales tales como células y orgánulos). Las partículas sólidas son normalmente polímeros, polímeros de adición o de condensación, que pueden dispersarse fácilmente en un medio líquido. Los ejemplos de partículas que pueden suspenderse incluyen, pero sin limitación, materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas, gotas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de partículas incluyen, pero sin limitación, 15 polímeros tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), polisacáridos tales como dextranos y dextranos modificados, etc.; usadas de por sí o junto con otros materiales. Las partículas sólidas pueden ser poliestireno, poli(acrilamida), homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres, amidas y siliconas.

[0023] El compuesto se recubre sobre las partículas, con frecuencia por unión covalente a las partículas. Dicha 20 unión covalente puede lograrse por técnicas bien conocidas comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970). En resumen, como se ha mencionado anteriormente, la superficie de la partícula puede ser 25 polifuncional o ser capaz de polifuncionalizarse. Están disponibles o pueden incorporarse una amplia diversidad de grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etileno, grupos hidroxilo y grupos mercapto. La forma de enlazar una amplia diversidad de compuestos a superficies es bien conocida y está ampliamente ilustrada en la bibliografía (véase anteriormente). La unión del miembro lateral puede ser directamente mediante un enlace o indirectamente a través de la intermediación de un 30 grupo de enlace. La longitud de un grupo de enlace puede variar ampliamente, dependiendo de la naturaleza del miembro lateral y de la partícula.

[0024] La proporción de moléculas de compuesto respecto a partícula está controlada en la unión de las moléculas de compuesto a la partícula. En una realización, el número de sitios funcionalizados en la superficie de la partícula 35 está controlado por ajuste del número de dichos sitios introducidos en la superficie de la partícula. Como alternativa, o junto con lo anterior, la proporción de moléculas de compuesto respecto a partícula puede controlarse por ajuste de la concentración del compuesto en el medio de reacción para la unión.

[0025] El reactivo de partículas empleado en la presente invención puede tratarse con una cantidad suficiente de 40 material para bloquear áreas de absorción en las partículas. Estos materiales no afectan al funcionamiento de las partículas. Los materiales de bloqueo incluyen, pero sin limitación, proteínas tales como albúmina de suero bovino, gammaglobulina bovina, y polisacáridos tales como dextrano. En otra realización, que puede utilizarse junto con lo anterior, se emplean partículas en las que el número de sitios funcionalizados para la unión reduce sustancialmente el área de adsorción en la superficie de las partículas.

[0026] Las partículas pueden comprender un marcador, unido a las mismas o incorporado en las mismas. El 45 marcador puede ser cualquier resto que pueda usarse con el fin de la detección. El marcador es con frecuencia un miembro de un sistema de producción de señales. El marcador es capaz de detectarse directa o indirectamente. El marcador puede ser isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un colorante, molécula 50 fluorescente, molécula quimioluminiscente, un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, coenzima, sustrato enzimático, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña o una secuencia polinucleotídica amplificable.

[0027] En una realización específica de la presente invención, las partículas contienen uno o más colorantes que 55 absorben en el infrarrojo. Dichos colorantes incluyen colorantes de bacterioclorina, bacterioclorofitina, meropolimetina, benzoanulenos, porfirinas de vinilo, colorantes de polimetina, cianinas y merocianinas. Los colorantes específicos incluyen, tetra-terc-butil-tetrakis(dimetilamino)-29H-31H-ftalocianina de cobre(II) y vanadil-tetra-terc-butil-tetrakis(dimetilamino)-29H-31H-ftalocianina. El colorante particular que se selecciona es uno de conveniencia, disponibilidad, estabilidad y compatibilidad con la partícula. Estos colorantes pueden incorporarse 60 directamente en la propia partícula, a través de polimerización o adsorción pasiva. Los colorantes pueden cargarse individualmente (es decir, secuencialmente) o en combinación (es decir, simultáneamente). Como alternativa, los colorantes pueden unirse a la perla en combinación con el componente de enlace, de modo que no se lixivien de la superficie. Independientemente del método de carga usado, las condiciones son tales que la superficie de la partícula no se ve afectada con respecto a la capacidad para aglutinarse en condiciones apropiadas.

[0028] Los colorantes pueden absorber luz en el rango de aproximadamente 750 nm-900 nm, particularmente en 65

el rango de aproximadamente 750-850 nm. Para muestras con altos niveles de eritrocitos, la luz es a aproximadamente 800 nm \pm 10 nm, que es el punto isosbético para la oxihemoglobina y la hemoglobina reducida. La cantidad de colorante empleado con las partículas varía con el coeficiente de extinción del colorante en el rango de luz de interés, la sensibilidad del ensayo necesaria, el tamaño de las partículas, el modo de unión del colorante a las partículas, y la compatibilidad del colorante con la matriz de partículas. La cantidad de colorante incorporado puede estar en el intervalo de aproximadamente el 1 al 20 por ciento en peso, más habitualmente del 5 al 15 por ciento en peso. Los colorantes adecuados incluyen, pero sin limitación, ftalocianinas. Las ftalocianinas sin metales absorben a aproximadamente 700 nm ($\epsilon = 162.000$). Los complejos de metales desplazan la absorción a una longitud de onda más corta o más larga, la mayoría de los metales desplazan la absorción a una longitud de onda mucho más corta, pero algunos, tales como el plomo, absorben a una longitud de onda mucho más larga que las ftalocianinas sin metales.

[0029] Los complejos formados entre metales de transición y ftalocianinas (metaloftalocianinas y metalonaftalocianinas) son químicamente muy estables a la luz y al calor. Se forman por condensación de oftalodinitrilos en presencia de un metal apropiado. Algunos de los metales usados en la formación de las metaloftalocianinas aparte del cobre (Cu) y del vanadio (V) son el magnesio (Mg), el zinc (Zn) y el cobalto (Co).

[0030] En una realización específica de la invención se emplean micropartículas carboxiladas con un máximo de absorción plano. Estas micropartículas se preparan por incorporación de múltiples colorantes que tienen un máximo de absorción distinto próximo a 805 nm. Esto da como resultado un espectro de absorción máxima plano a lo largo de una longitud de onda de amplio rango de 780-820 nm.

[0031] La muestra puede ser cualquier solución, sintética o natural, que se va a analizar en la que la muestra se ha sometido a un efecto de un antagonista de COX-1, particularmente aspirina. El término muestra incluye tejido biológico, incluyendo fluidos corporales, de un hospedador. La muestra puede examinarse directamente o puede pretratarse. La presente invención tiene aplicación particular para muestras que comprenden plaquetas, incluyendo fluidos corporales tales como, por ejemplo, sangre completa o fracciones sanguíneas que contienen plaquetas tales como plasma. En una realización la invención tiene aplicación particular para muestras de sangre completa. La cantidad de la muestra depende de la naturaleza de la muestra. Para muestras de fluido tales como sangre completa tratada como anticoagulante, la cantidad de la muestra es habitualmente de aproximadamente 30 μ l a 5000 μ l, preferentemente, de aproximadamente 100 a 300 μ l. El término "muestra" incluye muestras sin procesar directamente de un paciente o muestras que se han pretratado y preparado en cualquier medio líquido conveniente, habitualmente un medio acuoso (por ejemplo, citrato sódico).

[0032] Preferentemente, el medio para realizar los ensayos de acuerdo con la presente invención es un medio acuoso. También pueden emplearse otros codisolventes polares en el medio, habitualmente disolventes orgánicos oxigenados de 1-6, más habitualmente de 1-4 átomos de carbono, incluyendo alcoholes y éteres. Habitualmente, dichos codisolventes están presentes en menos de aproximadamente el 70 por ciento en peso, más habitualmente, en menos de aproximadamente el 30 por ciento en peso. Además, se emplean frecuentemente en el método de acuerdo con la presente invención diversos materiales adicionales. Por ejemplo, normalmente están presentes tampones en el medio de ensayo, así como estabilizantes para el medio de ensayo y los componentes de ensayo; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles.

[0033] El pH para el medio puede estar en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 11, preferentemente, de aproximadamente 4 a aproximadamente 9. Pueden usarse diversos tampones para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante el método. Los tampones ilustrativos incluyen HEPES, borato, fosfato, carbonato, Tris y barbital. El tampón particular empleado no es crítico para el método pero puede preferirse un tampón sobre otros en determinadas circunstancias. En algunas circunstancias se prefiere HEPES y está presente a una concentración de aproximadamente 0,05M a aproximadamente 0,001 M, pero generalmente a una concentración de aproximadamente 0,01 M.

[0034] El volumen de medio de ensayo puede ser de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 microlitros, habitualmente de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 microlitros. Los ensayos pueden llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado. Convenientemente, el recipiente es una cubeta o cartucho que se usa con el instrumento para llevar a cabo el ensayo y medir los resultados de ensayo. El recipiente de reacción contiene habitualmente el iniciador de la activación de acuerdo con la presente invención en forma liofilizada seca junto con otros reactivos tales como el reactivo de partículas y estabilizantes.

[0035] La combinación de muestra y reactivo de partículas se incuba en condiciones para aglutinar las partículas. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método. La temperatura puede ser constante o puede variar. Habitualmente, se emplea una temperatura constante durante la etapa de reacción. La temperatura empleada puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 80°C, más habitualmente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 45°C, preferentemente, la temperatura es de al menos 25°C, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 40°C, habitualmente de aproximadamente 37°C.

[0036] El grado de aglutinación de las partículas se determina y está relacionado con la presencia y/o cantidad del miembro en la muestra. La presencia de aglutinación puede determinarse visualmente por observación de la agregación de las partículas, lo que indicaría aglutinación. Preferentemente, como se ha mencionado anteriormente, las partículas pueden colorearse para contribuir a visualizar la aglutinación o agregación de la matriz. El grado de aglutinación puede medirse espectrofotométricamente, turbidimétricamente, nefelométricamente y por observación de la velocidad de cambio de la densidad óptica del medio.

[0037] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se está sometiendo a tratamiento con aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con partículas recubiertas con fibrinógeno, y la composición de AA y ácido ascórbico para formar un medio de ensayo. Las partículas del reactivo de partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. Después, el medio se irradia con luz en la región infrarroja. La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

[0038] El medio de aglutinación se selecciona para que tenga una elevada absorción a ~800 nm. La relación entre el coeficiente de absorción del medio de aglutinación y el coeficiente de absorción de sangre completa debería ser preferentemente superior a aproximadamente 4:1 a 800 nm. La relación de absorción para un ensayo particular está en función tanto del coeficiente de absorción del medio de aglutinación como de la concentración del medio de aglutinación en la muestra de ensayo.

[0039] Después de que la muestra se haya combinado con los reactivos, puede calentarse a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, pero por debajo de la que interferiría con el ensayo, para asegurar que la temperatura pueda controlarse sin afectar perjudicialmente al resultado del ensayo. De forma deseable, la temperatura puede ser de al menos 25°, preferentemente en el intervalo de 30-40°C, más preferentemente de aproximadamente 37°C. Habitualmente el medio de reacción se agita suavemente tras la combinación de los reactivos con la muestra y durante el periodo de la reacción. La agitación es suficiente para conseguir y mantener la homogeneidad en las muestras de ensayo. El tiempo total de las lecturas desde el tiempo cero (tiempo de mezcla) puede variar de aproximadamente 10 s a 10 min, más habitualmente de aproximadamente 30 s a 8 min, y preferentemente de aproximadamente 30 s a 3 min. Los datos pueden analizarse por cualquier medio conveniente, particularmente usando un algoritmo que pueda manipular los datos en relación con calibradores y/o controles.

[0040] El nivel de aglutinación es un indicio de la actividad de la función plaquetaria de la muestra ensayada. El nivel de aglutinación puede compararse frente a un patrón de actividad de la función plaquetaria conocida. Habitualmente, el resultado se comparará con un calibrador, lo que puede realizarse al mismo tiempo o haberse realizado previamente, o puede proporcionarse como una curva patrón.

[0041] El método de la presente invención puede emplearse junto con un ensayo para recuento de plaquetas tal como el descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos de N° de Serie 09/177.884 presentada el 23 de octubre de 1998 (la solicitud 884).

[0042] Los ensayos anteriores pueden realizarse preferentemente en un dispositivo, lo que permite que se produzcan las reacciones de acuerdo con la presente invención y mide los resultados de las mismas. El instrumento puede evaluar la función plaquetaria basándose en la capacidad de las plaquetas activadas para unirse a fibrinógeno. A medida que las plaquetas activadas se unen a y aglutinan partículas recubiertas con fibrinógeno, hay un aumento en la transmisión de luz. En general, un instrumento para medir el resultado del ensayo es uno que pueda medir la aglutinación. Preferentemente, el instrumento mide un cambio en la señal óptica debido a la aglutinación. Los instrumentos adecuados incluyen, a modo de ilustración y no como limitación un espectrofotómetro cinético, instrumento Ultegra System ® (después conocido como VerifyNow®) (disponible en el mercado en Accumetrics, San Diego, CA y empleado para mediciones rápidas de la actividad de la función plaquetaria en muestras normales).

[0043] El instrumento Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®) es un sistema de detección óptica basado en turbidimetría que mide la agregación inducida por plaquetas como un aumento en la transmisión de luz. El sistema consiste en un analizador, un cartucho desechable y controles. El cartucho contiene reactivos basados en la tecnología de aglutinación de micropartículas. El sistema de control de calidad incluye un control electrónico, dos niveles de controles "húmedos" ensayados (WQC), un sensor de humedad dentro del cartucho, un indicador de la temperatura en el envase y un ensayo para la concurrencia de dos canales de ensayo. El analizador controla la secuencia de ensayo, establece la temperatura de ensayo, controla la mezcla de reactivo-muestra durante la duración necesaria, determina el grado de función plaquetaria, visualiza el resultado y realiza autodiagnósticos. Para su uso en los presentes métodos el cartucho de ensayo del sistema contiene una preparación liofilizada que comprende partículas con ligando de receptor de GPII/IIIa unido covalentemente, una composición de AA y ácido ascórbico, y tampón. La muestra de paciente es habitualmente sangre completa tratada con citrato que se dispensa automáticamente desde el tubo de recogida de sangre en el cartucho por el analizador, sin que sea necesaria la manipulación de la sangre por el usuario. La interacción se controla mediante las características de absorbancia infrarroja de las partículas. A medida que las partículas interaccionan con las plaquetas, la aglutinación de las

partículas se mide a través del sistema óptico del analizador Ultegra™ (después conocido como VerifyNow®). La aglutinación se detecta como un aumento en la transmisión de luz infrarroja a través de la muestra. La cinética de reacción se analiza y se traduce en "unidades de respuesta a aspirina", URA.

5 **[0044]** En otra realización de la presente invención, se proporciona un kit que incluye en combinación envasada una preparación liofilizada que comprende partículas con fibrinógeno unido covalentemente, composición de AA y ácido ascórbico, y tampón. La preparación liofilizada puede estar presente en un recipiente de reacción tal como un cartucho usado en el instrumento de análisis. Para el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®) la preparación liofilizada puede ponerse en los pocillos exteriores del cartucho de cuatro pocillos usado en el
10 analizador. El kit también puede incluir un recipiente de recogida de muestra y/o un dispositivo para llevar a cabo el presente método. Las cantidades relativas de reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad de una determinación.

[0045] Cuando sea apropiado, los reactivos pueden ponerse en un envase hermético al aire para mantener la
15 actividad de cualquier reactivo. El envase puede ser, por ejemplo, un saco, bolsa, fabricado de un material que sea sustancialmente impermeable a la humedad. Dichos materiales incluyen, a modo de ejemplo y no como limitación, plástico y papel de aluminio. Además, el envase puede contener una bolsa desecante y un agente de absorción de oxígeno para mantener un entorno seco sin oxígeno. El agente de absorción de oxígeno puede ser como el Pharmakeep KC-20 de MGC o similar. El agente de absorción de oxígeno debería tener una capacidad de absorción
20 en el intervalo de 1 a 50 ml, e idealmente de 20 a 30 ml. Para muestras de sangre, el kit también puede incluir un artículo para perforar la piel de una persona, almohadillas desinfectantes o esterilizantes. El kit también puede incluir calibradores y patrones.

[0046] El kit puede incluir los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo de la presente invención. En una
25 realización, el kit incluye un vial de sangre, un tampón que mantiene el pH y la concentración salina de la muestra de sangre evaluada dentro de intervalos adecuados para la aglutinación mediada por plaquetas de la superficie sólida y perlas poliméricas pequeñas recubiertas con ligando de receptor de plaquetas GPIIb/IIIa. El tampón puede estar en solución, o puede consistir únicamente en la composición tamponante y sales a las que se añade una cantidad de agua conocida para dar la solución de tampón deseada. Opcionalmente, el kit también puede comprender un
30 anticoagulante. En una realización, el tampón es HEPES; el anticoagulante es citrato; un ligando de receptor de GPIIb/IIIa es fibrinógeno; las perlas poliméricas pequeñas son poliácridonitrilo o poliestireno carboxilado, en las que un ligando de receptor de GPIIb/IIIa peptídico, tal como fibrinógeno, está unido covalentemente a la superficie de la perla por medio de un enlace covalente entre el extremo N-terminal del péptido y un grupo de N-hidroxisuccinimida o carboxilato en la superficie de la perla; en una realización adicional, el kit comprende además un activador de
35 plaquetas tal como AA.

[0047] En una realización de la presente invención, se proporciona un reactivo de ensayo de un solo uso que contiene AA que puede almacenarse a temperatura ambiente durante tres meses o más.

40 EJEMPLO 1

[0048] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con un reactivo
45 que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa. Las partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de
50 ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

EJEMPLO 2

[0049] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con
55 aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa que se seleccionan de fibrinógeno, anticuerpo monoclonal 10E5, anticuerpo monoclonal c7E3, factor de von Willebrand, fibronectina, vitronectina, ligandos que tienen una secuencia de arginina glicina-ácido aspártico (RGD), y otros péptidos o peptidomiméticos que imiten esta secuencia. Las partículas tienen
60 uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

EJEMPLO 3

[0050] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. La cantidad de muestra analizada es de aproximadamente 30 μ l a 5000 μ l a 300 μ l. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa. Las partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

EJEMPLO 4

[0051] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa. Las partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. Se proporciona un tampón y el pH es de aproximadamente 2 a aproximadamente 11. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

EJEMPLO 5

[0052] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con utilización de un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa. Las partículas del reactivo de partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. El volumen del medio de ensayo es de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 microlitros. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

EJEMPLO 6

[0053] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con utilización de un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa. Las partículas del reactivo de partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. La combinación se somete a condiciones de aglutinación y se incuba a una temperatura de al menos 25°. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria.

EJEMPLO 7

[0054] En una realización específica de la presente invención, se realiza un ensayo para determinar la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre completa de un paciente que se esté sometiendo a tratamiento con aspirina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con utilización de un reactivo que incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas, para formar un medio de ensayo. El compuesto es un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos de receptor de GPIIb/IIIa. Las partículas del reactivo de partículas tienen uno o más colorantes infrarrojos incorporados en las mismas. La combinación se somete a condiciones de aglutinación y se incuba a una temperatura de al menos 25°. El medio se irradia con luz en la región infrarroja usando el Sistema Ultegra® (después conocido como VerifyNow®). La transmisión de luz infrarroja de la mezcla de ensayo se determina cuando el nivel de transmisión está relacionado con la actividad de la función plaquetaria. La aglutinación de las partículas se detecta como un aumento en la transmisión de luz infrarroja a través de la muestra.

[0055] La descripción anterior de realizaciones de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a las formas precisas descritas. Obviamente, serán evidentes muchas modificaciones y variaciones para los expertos en la materia. Se pretende que el alcance de la
5 invención se defina mediante las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la inhibición de plaquetas en una muestra de sangre completa obtenida de una persona tratada con aspirina, que comprende:
- 5 proporcionar dentro de un envase de dispositivo de ensayo de un solo uso un reactivo de ensayo liofilizado que contiene ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al máximo las plaquetas de la muestra de sangre completa y un antioxidante que reduce la velocidad de oxidación del ácido araquidónico y no interfiere con la función plaquetaria,
- 10 en el que dicho envase de dispositivo de ensayo de un solo uso comprende además un absorbente de oxígeno para crear un entorno inerte después del envasado del dispositivo de ensayo de un solo uso; y dicho dispositivo de ensayo de un solo uso es estable a temperatura ambiente durante al menos tres meses; y combinar dicha muestra de sangre completa con dicho reactivo de ensayo liofilizado dentro de un recipiente adecuado y medir la aglutinación de plaquetas en dicha muestra.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el reactivo de ensayo liofilizado se utiliza con partículas recubiertas con un ligando de receptor GPIIb/IIIa.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el reactivo de ensayo liofilizado incluye partículas recubiertas con un compuesto que da como resultado una aglutinación específica de plaquetas.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que el compuesto se selecciona de un anticuerpo contra un receptor de plaquetas y ligandos del receptor GPIIb/IIIa.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que el ligando del receptor GPIIb/IIIa se selecciona de fibrinógeno, anticuerpo monoclonal 10E5, anticuerpo monoclonal c7E3, factor de von Willebrand, fibronectina, vitronectina, ligandos que tienen una secuencia de arginina glicina-ácido aspártico (RGD), y otros péptidos o peptidomiméticos que imiten esta secuencia.
- 30 6. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas son de un tamaño de entre aproximadamente 0,1 micrones y aproximadamente 20 micrones.
7. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas son de un tamaño de entre aproximadamente 0,1 micrones y aproximadamente 10 micrones.
- 35 8. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas son de un tamaño de entre aproximadamente 1 micrón y no más de 8 micrones.
9. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas tienen una densidad de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,5 g/ml.
- 40 10. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas están funcionalizadas o pueden funcionalizarse para unirse covalentemente.
- 45 11. El método de la reivindicación 3, en el que el compuesto está recubierto sobre las partículas.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el compuesto está recubierto sobre las partículas por unión covalente.
- 50 13. El método de la reivindicación 3, en el que una proporción de moléculas de compuesto respecto a partículas está controlada en la unión de moléculas de compuesto a la partícula.
14. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas tienen áreas de adsorción bloqueadas.
- 55 15. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas incluyen un marcador.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el marcador es una porción usada con el fin de la detección.
17. El método de la reivindicación 3, en el que las partículas incluyen al menos un colorante que absorbe en el infrarrojo.
- 60 18. El método de la reivindicación 1, en el que una cantidad de muestra analizada es de aproximadamente 30 µl a aproximadamente 5000 µl.
- 65 19. El método de la reivindicación 3, en el que la muestra se trata con un medio acuoso.

20. El método de la reivindicación 19, en el que se usa un codisolvente polar con el medio acuoso.
21. El método de la reivindicación 19, en el que el medio acuoso incluye al menos un tampón.
- 5 22. El método de la reivindicación 21, en el que un pH para el medio acuoso es de aproximadamente 2 a aproximadamente 11.
23. El método de la reivindicación 21, en el que un pH del medio acuoso es de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
- 10 24. El método de la reivindicación 19, en el que un volumen del medio acuoso es de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 microlitros.
25. El método de la reivindicación 19, en el que un volumen del medio acuoso es de aproximadamente 75 a 15 aproximadamente 250 microlitros.
26. El método de la reivindicación 19, que comprende además:
- incubar la muestra y el medio acuoso para aglutinar las partículas.
- 20 27. El método de la reivindicación 26, que comprende además:
- medir la aglutinación de las partículas para determinar la actividad de la función plaquetaria.
- 25 28. El método de la reivindicación 26, en el que la muestra y el medio acuoso se incuban a una temperatura de al menos 25°C.
29. El método de la reivindicación 26, en el que la muestra y el medio acuoso se incuban a una temperatura de aproximadamente 30-40°C.
- 30 30. El método de la reivindicación 27, que comprende además:
- comparar una aglutinación medida de las partículas frente a un patrón de actividad de la función plaquetaria conocida.
- 35 31. El método de la reivindicación 27, en el que la aglutinación de las partículas se detecta como un aumento en la transmisión de luz infrarroja a través de la muestra.
32. Un dispositivo de ensayo de un solo uso para medir la inhibición de plaquetas en una muestra de sangre 40 completa obtenida de una persona tratada con aspirina, que comprende:
- un alojamiento con una pluralidad de canales y un orificio común de introducción de la muestra de sangre acoplado a cada uno de la pluralidad de canales; y
- 45 una pluralidad de reactivos, situados en canales separados de dicha pluralidad de canales, incluyendo la pluralidad de reactivos, dentro de un reactivo de ensayo liofilizado, ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al máximo las plaquetas de la muestra de sangre completa y un antioxidante que reduce la velocidad de oxidación del ácido araquidónico y no interfiere con la función plaquetaria,
- en el que dicho dispositivo de ensayo de un solo uso es estable a temperatura ambiente durante al menos tres meses.
- 50 33. Un dispositivo de ensayo de un solo uso para medir la inhibición de plaquetas en una muestra de sangre completa obtenida de una persona tratada con aspirina, que comprende:
- un reactivo de ensayo liofilizado que contiene ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al 55 máximo las plaquetas de la muestra de sangre completa y un antioxidante que reduce la velocidad de oxidación del ácido araquidónico y no interfiere con la función plaquetaria;
- un absorbente de oxígeno para crear un entorno inerte después del envasado del dispositivo de ensayo de un solo uso; y
- un envase de dispositivo de ensayo de un solo uso que incluye dicho reactivo de ensayo liofilizado y dicho 60 absorbente de oxígeno,
- en el que dicho dispositivo de ensayo de un solo uso es estable a temperatura ambiente durante al menos tres meses.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 5763199 A [0011] • US 17788498 A [0041]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 15 • Helena Laboratories. *Evaluation of Platelet Function Wall Chart*, 586-25 [0005]
- Platelet lipids. **MARCUS AJ ; COLEMAN RW ; HIRSH J ; MARDER VJ ; SALZMAN EW**. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. JB Lippencott Company, 1982, 472 [0005]
- 20 • **BYE A ; LEWIS Y ; O'GRADY J**. Effect of a single oral dose of aspirin on the platelet aggregation response to arachidonic acid. *Br J Clin Pharmac*, 1979, vol. 7, 283 [0005]
- 25 • **MONCADA S ; VANE JR**. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. *N Eng JMed*, 1979, vol. 300, 1142 [0006]
- 30 • **INGERMAN CM ; SMITH JB ; SHIPIRO S ; SEDAR A ; SILVER A ; SILVER MJ**. Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency. *Blood*, 1978, vol. 52, 332 [0006]
- **STEISKAL et al**. *Application of Cationic Propyl Gallate as Inducer of Thrombocyte Aggregation For Evaluation of Effectiveness of Antiaggregation Therapy* [0010]
- **COLLER et al**. *J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 72, 325 [0020]
- *N.E. Journal of Med.*, 1994, vol. 330, 956 [0020]
- **COOK et al**. *Drugs of the Future*, 1994, vol. 19, 135 [0020]
- *Immobilized Enzymes*. Halsted Press, 1978 [0023]
- **CUATRECASAS**. *J. Biol. Chem.*, 1970, vol. 245, 3059 [0023]