

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 544**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04756747 .4**
96 Fecha de presentación: **06.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1641492**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Activación selectiva de plaquetas para el seguimiento de terapia con antagonistas de ADP**

30 Prioridad:
08.07.2003 US 485703 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.04.2012

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

72 Inventor/es:
**COLLER, Barry S. y
DURBIN, Dennis**

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 378 544 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

Activación selectiva de plaquetas para el seguimiento de terapia con antagonistas de adp

Campo de la Invención:

5 **[0001]** Esta invención se refiere al campo de los ensayos para el diagnóstico y, en particular, a la determinación de la función de la actividad plaquetaria en muestras sanguíneas para el estudio de los efectos de las composiciones antiplaquetarias, y más específicamente al doble uso de un activador de las plaquetas (como el ADP) y un inhibidor de las plaquetas (como la Prostaglandina E1 (PGE1)) para la medida de la función plaquetaria de los inhibidores P2Y12, incluso el clopidogrel, CS-747 (Sankyo) y la ticlopidina de sensibilidad aumentada.

Descripción de la Técnica Mencionada:

10 **[0002]** El papel de las plaquetas en la fisiología de los mamíferos es extraordinariamente variado, pero su papel primordial es promover la hemostasis. En algunas situaciones, se desea una evaluación de la capacidad de la sangre para la coagulación, un parámetro que frecuentemente se controla por la capacidad de adhesión y/o agregación de las plaquetas. Por lo tanto, es de interés la evaluación de las funciones adhesivas de las plaquetas. Por ejemplo, cuestiones de interés incluyen si administrar fármacos que bloquearán, o promoverán, la formación de coágulos, o si detectar deficiencias en la función plaquetaria antes de los
15 procedimientos quirúrgicos. También es de interés la evaluación de la eficacia de un inhibidor de las plaquetas que se está ensayando como un nuevo fármaco o que se está usando como tratamiento clínico aprobado en un paciente.

20 **[0003]** Se sabe que las plaquetas se agregan en una variedad de condiciones y en presencia de un número de diferentes reactivos. La agregación de las plaquetas es un término usado para describir la unión de las plaquetas entre sí. La agregación de las plaquetas *in vitro* depende de la capacidad de las plaquetas de unir fibrinógeno a sus superficies tras la activación mediante un agente inductor de la agregación como el ADP o el colágeno.

[0004] Las plaquetas juegan un papel crítico en el mantenimiento de una hemostasis normal. Cuando las plaquetas se exponen a un vaso sanguíneo dañado, se adherirán a la matriz subendotelial expuesta. Siguiendo a la adhesión inicial, diversos factores liberados o producidos en el lugar de la lesión, como la trombina, ADP y colágeno activan las plaquetas. Una vez que las plaquetas se activan, se produce un cambio conformacional en el receptor plaquetario glicoproteína GPIIb/IIIa,
25 permitiéndole la unión con el fibrinógeno y/o con el factor de von Willebrand.

[0005] Esta unión del fibrinógeno multivalente y/o las moléculas del factor de von Willebrand mediante los receptores GPIIb/IIIa en las plaquetas adyacentes da como resultado el reclutamiento de plaquetas adicionales hacia el lugar de la lesión y su agregación para formar tapones hemostáticos o trombos.

30 **[0006]** La agregometría plaquetaria *in vitro* es el procedimiento de laboratorio usado para evaluar la capacidad *in vivo* de las plaquetas para formar agregados anteriores al tapón hemostático. En esta técnica se añade un agente agregante como el ADP o el colágeno a la sangre entera o al plasma rico en plaquetas y la agregación de las plaquetas se monitoriza. La agregometría plaquetaria es una herramienta de diagnóstico que puede ayudar en el diagnóstico del paciente y en la selección de la terapia. Los ensayos actuales para medir la agregación plaquetaria son caros, consumen mucho tiempo, son engorrosos y, generalmente no son adecuados para el entorno clínico.

35 **[0007]** Se ha desarrollado recientemente un ensayo rápido de la función plaquetaria y se ha descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.763.199. El ensayo determina el bloqueo del receptor de glicoproteína (GP) en sangre total. La aglutinación de pequeñas perlas de polímero recubiertas con un ligando GPIIb/IIIa tales como el fibrinógeno resulta cuando las perlas se ponen en contacto con la sangre entera que contiene las plaquetas con los receptores de GPIIb/IIIa activados que no están bloqueados. El fallo en la aglutinación indica bien un fallo de los receptores
40 GPIIb/IIIa que llegan a ser activados y/o el bloqueo de los receptores GPIIb/IIIa. En una realización preferida, la adición de un activador de un receptor de trombina conduce a un ensayo que es lo bastante rápido y conveniente para llevarse a cabo como cabecera y que resulta en la aglutinación de pequeñas perlas de polímero en un período de tiempo conocido y conveniente si los receptores GPIIb/IIIa no están bloqueados. El ensayo incluye la capacidad para transferir sangre para su ensayo desde un depósito de colección a un dispositivo de ensayo sin abrir el depósito
45 de colección. Éste ensayo de agregación plaquetaria se puede llevar a cabo al mismo tiempo que el tiempo de coagulación activado (ACT), que se realiza para evaluar la capacidad de la heparinización.

[0008] La agregación plaquetaria juega un papel principal en la patogénesis de la trombosis y en la enfermedad arterial coronaria aguda. La evidencia sugiere que existe una variabilidad significativa en la función plaquetaria en la respuesta a diversos agentes antiplaquetarios. También se ha demostrado que existe una variabilidad interindividual
50 en la agregación plaquetaria cuando los antagonistas P2Y12 tales como el clopidogrel se usan en el tratamiento de pacientes para conseguir efecto de antiagregación. Los resultados de un estudio demostraron que al menos el 10% de los pacientes que recibieron el fármaco no lograron la inhibición de la agregación plaquetaria esperada (Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M; Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placemen Thromb Haemost. 2003 May, 89(5):783-
55 7).

[0009] El clopidogrel y la ticlopidina son derivados de la tienopiridina que inhiben la agregación plaquetaria. Se cree

que inhiben la unión de la adenosina 5-difosfato (ADP) a uno de sus receptores, el receptor P2Y12. La actividad farmacológica del clopidogrel es muy similar a la actividad farmacológica de la ticlopidina. Sin embargo, se ha mostrado que el clopidogrel tiene menos efectos secundarios que la ticlopidina. Basado en la creciente evidencia de la eficacia del clopidogrel en la enfermedad trombótica, el uso de clopidogrel y otros antagonistas P2Y12 probablemente va a aumentar de forma significativa.

[0010] Dado que muchos pacientes con enfermedad cardiovascular están tomando actualmente uno de los agentes de tienopiridina, sería beneficioso un procedimiento para la detección de la resistencia a la tienopiridina y evaluación de la eficacia del tratamiento con tienopiridina. De esta manera, existe una necesidad de desarrollar un ensayo que proporcione información acerca de la aspirina y de la tienopiridina, por ejemplo, de la sensibilidad y eficacia del tratamiento con clopidogrel o con ticlopidina en un paciente dado.

[0011] Los efectos de estos agentes en la función plaquetaria se han evaluado con agregometría de plaquetas usando ADP, colágeno u otros activadores plaquetarios. Sin embargo, dado que el ADP activa al menos dos receptores diferentes (P2Y1 y P2Y12 y quizá P2X1), tiene el potencial para una menor especificidad y ruido de fondo. El colágeno es otra alternativa. Sin embargo el colágeno es altamente variable debido a su estructura cuaternaria, que afecta de forma dramática a su capacidad para activar las plaquetas y debido a este hecho se deriva a partir de tejidos biológicos y es sensible a menores cambios en la temperatura y el pH. Ni el colágeno ni el ADP proporcionan especificidad al receptor P2Y12 y por tanto no son la elección óptima por sí mismos para la determinación de los efectos inhibidores del P2Y12. En particular y como se ha mostrado en varios estudios, la elección de la concentración de estos dos agonistas tiene un efecto significativo en el grado de inhibición de los antagonistas P2Y12 que se midió.

[0012] Las prostaglandinas (PGs) pertenecen a la ubicua clase de productos químicos conocida como eicosanoides. Se encuentran en prácticamente cada tejido del cuerpo y tienen un espectro muy amplio de actividades biológicas. Los eicosanoides son derivados del ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado. El término eicosanoides incluye la familia de las prostaglandinas, las prostacilinas, los tromboxanos y los leucotrienos. Las prostaglandinas (PGs) se dividen en diferentes familias dependiendo de su estructura, cada una designada por una letra (A, E, F, G, H, o I). Además de esta letra, cada prostaglandina individual porta un dígito que indica el número de dobles enlaces en su cadena lateral de ácido graso. Por ejemplo, la prostaglandina E1 (PGE1) pertenece a la familia E y solamente tiene un doble enlace en su cadena lateral. Las prostaglandinas juegan un papel importante en la agregación plaquetaria y en la hemostasis (coagulación sanguínea) y generalmente tienen un marcado efecto vasodilatador.

[0013] La prostaglandina E1 es el metabolito teórico de la ciclooxigenasa del ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA), pero es prácticamente indetectable en el plasma de los humanos normales o de otros animales. Su farmacología incluye la vasodilatación, la hipotensión y actividades antiplaquetarias. Se ha mostrado que la prostaglandina E1 inhibe la agregación plaquetaria por incremento de las concentraciones del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) en las plaquetas. Un número de grupos ha demostrado que el IC50 de la prostaglandina E1 para la inhibición de la agregación plaquetaria humana inducida por ADP es aproximadamente 40 nM.

Sumario de la invención

[0014] Un objeto de la presente invención es proporcionar los procedimientos y los kits de ensayo de una muestra de sangre que se ha afectado por un antagonista P2Y12 medido mediante el uso de una combinación de ADP y de prostaglandina E1 como activador.

[0015] El objeto de la presente invención se logra en un procedimiento que determina si un individuo tiene una capacidad reducida para formar trombos plaquetarios debido a la inhibición de la iniciación de la activación plaquetaria, transducción de la señal y/o bloqueo de GPIIb/IIIa. Se obtiene una muestra de sangre a partir del individuo que se evalúa. La muestra de sangre se mezcla en combinación con 1) un anticoagulante; 2) el suficiente tampón para mantener el pH y la concentración salina de la sangre anticoagulada en un intervalo adecuado para la agregación plaquetaria; 3) un ligando receptor GPIIb/IIIa de plaquetas inmovilizado en una superficie sólida; 4) uno o más agentes para potenciar el camino de la transducción de la señal y 5) un activador del receptor. La combinación se incuba en condiciones para la aglutinación de partículas. Se evalúa la aglutinación mediada por las plaquetas en la mezcla agitada. La ausencia de aglutinación indica que el individuo presenta una capacidad reducida para formar trombos plaquetarios.

[0016] En otra realización de la presente invención, se proporciona un kit que incluye un anticoagulante y un tampón para mantener el pH y la concentración salina de la sangre anticoagulada en un intervalo adecuado para la agregación plaquetaria. También se proporciona un ligando receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas inmovilizado en una superficie sólida y un activador del receptor con agentes adicionales para potenciar el camino de la transducción de la señal.

[0017] En otra realización de la presente invención, se proporciona un método para determinar si un individuo tiene una capacidad reducida para formar trombos plaquetarios debido a la inhibición de la iniciación de la activación plaquetaria, transducción de la señal y/o bloqueo del GPIIb/IIIa usando la activación controlada de la plaqueta. Se proporcionan un activador plaquetario y uno o más inhibidores plaquetarios. Se produce un camino de transducción

de señal alternativo.

[0018] En otra realización de la presente invención, se proporciona un kit que incluye un ligando receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas inmovilizado en una superficie sólida, uno o más agentes para potenciar el camino de transducción de la señal y un activador del receptor.

5 Breve descripción de las figuras

[0019]

La figura 1 ilustra la respuesta media de un individuo.

La figura 2 ilustra la respuesta media de cinco individuos.

10 La figura 3 ilustra el alcance de la agregación plaquetaria de una muestra de sangre tratada con el antagonista de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

[0020] En diversas realizaciones de la presente invención, se utiliza una composición de ADP y la prostaglandina E1 como activador en la medida de la inhibición de la agregación plaquetaria mediante antagonistas P2Y12 tales como las tienopiridinas en muestras de sangre entera. En consecuencia, las composiciones mencionadas anteriormente se
15 pueden emplear para determinar la eficacia de la terapia antiplaquetaria que involucra el tratamiento de los pacientes con una tienopiridina. Las composiciones descritas anteriormente se pueden emplear conjuntamente con partículas recubiertas con un ligando del receptor GPIIb/IIIa y con cualquier otro reactivo necesario para llevar a cabo un ensayo de la eficacia de las tienopiridinas. Se puede usar una composición de reactivos liofilizada que comprenda la composición del activador y de las partículas mencionada anteriormente. En una aproximación, el volumen medido
20 de una muestra será medido de modo que la sangre entera se mezcle mecánicamente con el reactivo liofilizado. Se monitoriza un cambio en la transmisión de la luz y se calcula un índice de la actividad plaquetaria. En un aspecto una muestra de sangre entera se combina en una cubeta o un cartucho unitario con el reactivo liofilizado mencionado anteriormente. Se puede emplear un aparato para llevar a cabo el ensayo. El aparato comprende un pocillo para recibir la muestra donde el pocillo contiene el reactivo liofilizado y otros reactivos para llevar a cabo el ensayo. Los
25 reactivos adicionales pueden ser diversos tampones y/o estabilizadores de la liofilización.

[0021] Como se mencionó anteriormente, la presente invención se dirige en un aspecto a un procedimiento para llevar a cabo un ensayo para medir la actividad de la función plaquetaria en una muestra de sangre entera. En una realización, la muestra es una que ha sido afectada por un antagonista de la adenosina 5-fosfato (ADP). Por ejemplo, la muestra puede ser de un paciente sometido a un tratamiento con un antagonista de la adenosina 5-fosfato (ADP). En la presente invención se proporcionó una combinación en un medio de ensayo donde la
30 combinación comprende la muestra y una composición de ADP y de prostaglandina E1. Por lo general, la concentración final de ADP es de 2 a 35 μ M preferentemente, de 15 a 20 μ M y la concentración final de la prostaglandina E1 es de 2 a 30 nM, preferentemente de 20 a 25 nM.

[0022] En los presentes procedimientos también se emplea un reactivo que comprende partículas recubiertas con un compuesto que puede resultar de la aglutinación específica de las plaquetas, es decir, la aglutinación de las
35 plaquetas mediante una interacción específica entre un receptor en las plaquetas y el compuesto en las partículas. Tales compuestos incluyen, como medio de ilustración y no de limitación, los anticuerpos de un receptor plaquetario y los ligandos del receptor GPIIb/IIIa, que pueden ser una molécula orgánica de pequeño tamaño, un polipéptido, una proteína, un anticuerpo monoclonal o un ácido nucleico que se una, forme complejos o que interactúe con los
40 receptores GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas. La agregación de las partículas por mediación de las plaquetas sucede cuando los receptores de GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas se unen, forman complejos o interactúan de otra manera con los ligandos del receptor GPIIb/IIIa en las partículas. Los ligandos típicos GPIIb/IIIa incluyen el 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, la
45 fibronectina, la vitronectina y otros ligandos que presentan una secuencia de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) u otros péptidos o péptido miméticos que imitan esta secuencia (Cook, et al., Drugs of the Future 19:135 (1994)). Otros compuestos de interés incluyen inhibidores de la trombina, heparina de bajo peso molecular, etcétera.

[0023] Las partículas a las que se une el compuesto son al menos de 0,1 micra y no mayores de 20 micras. En una realización las partículas son aproximadamente de 0,1 micras hasta aproximadamente 10 micras. En otra realización
50 las partículas son de aproximadamente 1 micra y no inferiores a 8 micras. Las partículas pueden tener prácticamente cualquier forma, pero son generalmente esféricas y con diámetros uniformes. La partícula puede tener cualquier densidad, pero preferentemente con una densidad aproximada a la del agua, generalmente alrededor de 0,7 hasta aproximadamente 1,5 g/ml. Las partículas pueden tener o no una carga en la superficie, tanto positiva como negativa, preferentemente negativa. Las partículas son funcionalizadas o funcionalizables con el fin de unir o enlazar
55 a su superficie de modo covalente tales miembros, tanto directa como indirectamente.

[0024] Las partículas pueden ser sólidas (por ejemplo, comprendidas por polímeros orgánicos e inorgánicos o por

látex), gotitas de aceite (por ejemplo, hidrocarburos, fluorocarbono, fluido de silicona), o vesículas (por ejemplo, sintéticos como los fosfolípidos o naturales tales como las células y los orgánulos). Las partículas sólidas normalmente son polímeros, tanto polímeros de adición como de condensación, los cuales se dispersan fácilmente en un medio líquido. Ejemplos de partículas suspendibles son los materiales poliméricos como el látex, las bifases lipídicas, gotitas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de partícula incluyen polímeros, tales como la nitrocelulosa, el acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metil buteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), polisacáridos como los dextranos y dextranos modificados, etcétera; tanto usados por sí mismos como conjuntamente con otros materiales. Las partículas sólidas pueden comprender poliestireno, poli(acrilamida), homopolímeros y copolímeros de los derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas, siliconas y similares.

[0025] Como se mencionó anteriormente, el compuesto está recubierto en las partículas. Normalmente, el compuesto está unido a las partículas de modo covalente. Tal unión covalente se puede conseguir mediante técnicas muy bien conocidas, disponibles generalmente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978) and Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970)". En resumen, y como se mencionó anteriormente, la superficie de la partícula puede ser polifuncional o ser capaz de ser polifuncionalizada. Una amplia variedad de grupos funcionales está disponible o se pueden incorporar. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, grupos etileno, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. La forma de unión de una amplia variedad a superficie de los compuestos se conoce muy bien y se ilustra generalmente en la literatura (véase anteriormente). La unión del miembro lateral se puede hacer de modo directo por un enlace o de modo indirecto por la intermediación de un grupo de enlace. La longitud del grupo de enlace puede variar generalmente, dependiendo de la naturaleza del miembro lateral y de la partícula.

[0026] La relación de las moléculas del compuesto y de las partículas se controla en la unión de las moléculas del compuesto con la partícula. En una aproximación el número de sitios funcionalizados en la superficie de la partícula se pueden controlar por el ajuste del número de tales sitios insertados en la superficie de la partícula. De modo alternativo, o en conjunto con lo anterior, la relación de las moléculas del compuesto y la partícula se puede controlar por el ajuste de la concentración del compuesto en el medio de reacción para la unión. Sobre el contenido anterior se sugerirán otras aproximaciones a alguien experto en la materia.

[0027] El reactivo de partícula empleado en la presente invención se puede tratar con una cantidad suficiente de material para bloquear las áreas de adsorción en las partículas. Tales materiales no afectarán el funcionamiento de las partículas para el objetivo que se pretende en la presente invención. Los materiales de bloqueo incluyen proteínas tales como la albúmina de suero bovino, gammaglobulina bovina, etcétera, polisacáridos tales como el dextrano, etcétera, y similares. En otra aproximación, que se puede utilizar en conjunto con las anteriores, las partículas se emplean cuando el número de sitios funcionalizados para la unión reduce sustancialmente el área de absorción en la superficie de las partículas.

[0028] Las partículas normalmente comprenden un marcador, tanto unido a ello como incorporado en ello. El marcador puede ser cualquier fracción que se pueda usar con el propósito de la detección. El marcador es a menudo un miembro de un sistema productor de señales. El marcador es capaz de ser detectado directa o indirectamente. El marcador puede ser isotópico o no isotópico, normalmente no isotópico, y puede ser un colorante, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido codificador para un catalizador, un promotor, un coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radioactivo, una molécula orgánica pequeña, una secuencia amplificable de polinucleótidos, y así sucesivamente.

[0029] En una realización específica de la presente invención, las partículas contienen uno o más colorantes que absorben en el infrarrojo. Tales colorantes incluyen la bacterioclorina, bacterioclorofitina, colorantes de meropolimetina, benzoanulenos, vinílogos de porfirinas, colorantes de polimetina, cianinas y merocianinas y similares. Colorantes específicos de interés son Cobre(II)-tetra-terc-butil-tetrakis (dimetilamino)-29H-31H-ftalocianina y Vanadil-tetra-terc-butil-tetrakis (dimetilamino)-29H-31H-ftalocianina. El colorante que se selecciona en particular es uno con ventajas, disponibilidad, estabilidad, compatibilidad con la partícula y similares. Estos colorantes se pueden incorporar directamente a la partícula en sí misma, mediante polimerización o mediante adsorción pasiva. Los colorantes se pueden cargar individualmente (es decir, en secuencia) o en combinación (es decir, de modo simultáneo). De modo alternativo, los colorantes se pueden unir a la perla en combinación con el componente de enlace, de tal manera que no lixivien en la superficie. Con independencia del procedimiento de carga usado, las condiciones son tales que la superficie de la partícula no se ve afectada con respecto a la capacidad de aglutinar en las condiciones apropiadas.

[0030] Los colorantes absorben la radiación en el intervalo entre 750 nm y 900 nm, en particular en el intervalo entre 750 y 850 nm. Para las muestras con altos niveles de glóbulos rojos, la radiación aproximadamente es de 800 nm \pm 10 nm, que es el punto isosbético para la oxihemoglobina y para la hemoglobina reducida. La cantidad de colorante empleado en las partículas varía con el coeficiente de extinción del colorante en el intervalo de luz de interés, la sensibilidad requerida para el ensayo, el tamaño de las partículas, el modo de unión del colorante a las partículas, la compatibilidad de colorante con la matriz de la partícula y similares. Por lo general, la cantidad de colorante que se incorpora está en el intervalo entre el 1% y el 20% en peso, más generalmente entre el 5% y el 15% en peso. Los colorantes que tienen un uso particular a la presente invención son las ftalocianinas: las ftalocianinas no metálicas

absorben la radiación aproximadamente a 700 nm ($\epsilon = 162000$). Los complejos metálicos desplazan la absorción a una longitud de onda mayor o menor, la mayoría de los metales desplazan la absorción a una longitud de onda mucho más corta, pero algunos, tales como el plomo absorben en una longitud de onda mucho mayor que en la que lo hacen las ftalocianinas no metálicas.

5 **[0031]** Los complejos formados entre los metales de transición y las ftalocianinas (metaloftalocianinas y metalonaftalocianinas) son muy estables químicamente a la luz y al calor. Se forman por la condensación de los isómeros ópticos de ftalodinitrilos en presencia de un metal apropiado. Algunos de los metales usados en la formación de las metaloftalocianinas, además del cobre (Cu) y el vanadio (V), son el magnesio (Mg), el cinc (Zn) y el cobalto (Co).

10 **[0032]** En una realización específica de la invención se emplean micropartículas carboxiladas con un máximo de absorción plano. Estas micropartículas se preparan al incorporar colorantes múltiples que tienen distintos máximos de absorción cercanos a 805 nm. Esto da como resultado un espectro de absorción con una parte plana en el máximo en un amplio intervalo de longitud de onda desde 780 a 820 nm.

[0033] La muestra de ser cualquier solución, sintética o natural, para ser analizada donde la muestra esté sometida a un efecto a partir del antagonista P2Y12, en particular, una tienopiridina, potencialmente en combinación con aspirina. El término muestra incluye tejido biológico, incluyendo fluidos biológicos, a partir de un huésped, etcétera. La muestra, por lo general, se puede examinar directamente o se puede tratar previamente. La presente invención tiene una aplicación particular en muestras que comprenden plaquetas, incluyendo fluidos corporales tales como, por ejemplo, sangre entera, fracciones sanguíneas que contienen plaquetas tales como el plasma, y similares. En una realización, la invención tiene una aplicación particular en muestras de sangre entera. La cantidad de muestra depende de la naturaleza de la muestra. Para muestras fluidas tales como sangre entera anticoagulada, la cantidad de muestra, por lo general, es aproximadamente de 30 μl a 5000 μl , preferentemente, alrededor de 100 a 300 μl . El término "muestra" incluye muestras no procesadas directamente a partir de un paciente o muestras que han sido tratadas previamente y preparadas en cualquier medio líquido conveniente, por lo general un medio acuoso (por ejemplo, citrato sódico).

[0034] Preferentemente, el medio para realizar los ensayos de acuerdo con la presente invención es un medio acuoso. Se pueden emplear también en el medio otros cosolventes polares, por lo general disolventes orgánicos oxigenados de uno a seis átomos de carbono, más generalmente de uno a cuatro átomos de carbono, incluyendo alcoholes, éteres y similares. Por lo general, tales cosolventes están presentes en una cantidad menor al 70% en peso, más generalmente, en menos del 30% en peso. Por lo general, se emplean frecuentemente varios materiales auxiliares en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los tampones están presentes normalmente en el medio de ensayo, así como estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes del ensayo; tensioactivos, generalmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de enlace, por ejemplo, glicoles de polialquileño; o similares.

30 **[0035]** Por lo general, el pH del medio está en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 11 unidades, preferentemente, de aproximadamente 4 a aproximadamente 9. Se pueden usar diversos tampones para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante el procedimiento. Tampones ilustrativos incluyen HEPES, borato, fosfato, carbonato, Tris, barbital, y similares. El tampón particular empleado no es crítico en el procedimiento pero un tampón se puede preferir sobre otros en determinadas circunstancias. En algunas circunstancias se prefiere HEPES y está presente en una concentración de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,001 M pero generalmente en una concentración de aproximadamente 0,01 M.

[0036] El volumen del medio de ensayo es de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 microlitros, por lo general de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 microlitros. Los ensayos se pueden realizar en cualquier recipiente adecuado. Convenientemente, el recipiente es una cubeta o cartucho que se usa con un instrumento para realizar el ensayo y para medir los resultados del ensayo. El recipiente de reacción generalmente contiene el iniciador de activación de acuerdo con la presente invención en forma liofilizada seca con otros reactivos tales como reactivos de partículas y similares, estabilizadores etcétera.

45 **[0037]** La combinación de la muestra y el reactivo de partículas se incuban en condiciones para la aglutinación de partículas. Se emplean normalmente temperaturas moderadas para llevar a cabo el procedimiento. La temperatura puede ser constante o puede variar. Por lo general, se emplea una temperatura constante durante la etapa de reacción. La temperatura empleada es normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 $^{\circ}\text{C}$, más normalmente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 $^{\circ}\text{C}$, preferentemente, la temperatura debería ser de al menos 25 $^{\circ}\text{C}$, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 $^{\circ}\text{C}$, normalmente aproximadamente 37 $^{\circ}\text{C}$.

55 **[0038]** Se determina la extensión de la aglutinación de las partículas y se relaciona con la presencia y/o con la cantidad del miembro en la muestra. La presencia de aglutinación se puede determinar visualmente mediante la observación de grumos de las partículas, lo que indicaría aglutinación. Preferentemente, como se mencionó anteriormente, las partículas se pueden colorear para ayudar en la visualización de la aglutinación o agrupación en la matriz. La extensión de la aglutinación se puede medir espectrofotométricamente, turbidimétricamente,

nefelométricamente, etcétera, mediante la observación de la tasa de cambio de la densidad óptica del medio, etcétera.

[0039] En una realización específica de la presente invención se realiza un ensayo para la función plaquetaria en una muestra de sangre entera de un paciente sometido a un tratamiento con una tienopiridina. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de reacción, con partículas recubiertas de fibrinógeno, y la composición de ADP y prostaglandina E1 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 las condiciones de aglutinación. Entonces, el medio se irradia con luz en la región del infrarrojo. Se determina la transmisión de la luz infrarroja de la mezcla de ensayo donde el nivel de transmisión se relaciona con la actividad de la función plaquetaria.

[0040] El medio de aglutinación se selecciona para que tenga una alta absorción a aproximadamente 800 nm. La relación entre el coeficiente de absorción del medio de aglutinación y el coeficiente de absorción de sangre entera debería ser preferentemente mayor que aproximadamente 4:1 a 800 nm. La relación de absorción para un ensayo particular es una función tanto del coeficiente de absorción del medio de aglutinación como de la concentración del medio de aglutinación en la muestra de ensayo.

[0041] Después de que la muestra se haya combinado con los reactivos, es deseable que se caliente a una temperatura superior a la temperatura ambiente, pero por debajo de aquella que podría interferir con el ensayo, de forma que se asegure que la temperatura se pueda controlar sin afectar de forma adversa al resultado de ensayo. De forma deseable, la temperatura debería ser al menos -25 °C, preferentemente en el intervalo de 30 a 40 °C, más preferentemente de aproximadamente 37 °C. El medio de reacción normalmente se agita cuidadosamente hasta que se combinen los reactivos con la muestra y durante el período de la reacción. La agitación es suficiente para conseguir y mantener la homogeneidad en las muestras de ensayo. El tiempo total de las lecturas a partir del tiempo cero (tiempo de mezclado), puede abarcar el intervalo de aproximadamente 10 segundos a 10 minutos, más generalmente de aproximadamente 30 segundos a ocho minutos, y preferentemente de aproximadamente 30 segundos a 3 minutos. Los datos se pueden analizar mediante cualquier medio conveniente, particularmente usando un algoritmo que pueda manipular los datos con relación a los calibradores y/o los controles.

[0042] El nivel de aglutinación es una indicación de la actividad de la función plaquetaria de la muestra ensayada. El nivel de aglutinación se puede comparar frente a un estándar de una actividad de función plaquetaria conocida. Normalmente, el resultado se comparará con un calibrador, que se puede realizar de forma concomitante o que se haya realizado previamente o que se pueda proporcionar como una curva estándar.

[0043] El método de la presente invención se puede emplear conjuntamente con un ensayo para recuento plaquetario tal como el descrito en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de N° de Serie 09/177. 884 presentada el 23 de octubre de 1998 (la solicitud '884).

[0044] Los ensayos descritos anteriormente se pueden realizar preferentemente en un dispositivo que permita que las reacciones ocurran de acuerdo con la presente invención y que mida los resultados de las mismas. El instrumento evaluaría la función plaquetaria basándose en la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Dado que las plaquetas activadas se unen y aglutinan con las partículas recubiertas de fibrinógeno, existe un incremento en la transmitancia 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 debida a la aglutinación. Los instrumentos adecuados incluyen, como forma de ilustración y no de limitación un espectrofotómetro cinético, el instrumento Ultegra System ® (disponible comercialmente en Accumetrics, San Diego, CA y empleado para las medidas rápidas de la actividad de la función plaquetaria en muestras normales), o similares.

[0045] El instrumento Ultegra System ® es un sistema de detección óptica basado en turbidimetría, que mide la agregación inducida por las plaquetas como un incremento en la transmitancia de luz. El sistema consiste en un analizador, un cartucho desechable y controles. El cartucho contiene los 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 en el cartucho, un indicador de temperatura en el embalaje, y un ensayo de concurrencia de los dos canales ensayo. El analizador controla la secuenciación del ensayo, establece la temperatura del ensayo, controla la mezcla de la muestra de reacción durante el periodo de tiempo requerido, determina el grado de la función plaquetaria, visualiza el resultado y realiza un autodiagnóstico. Para su uso en los presentes procedimientos el cartucho de ensayo del sistema contiene una preparación liofilizada que comprende partículas con el ligando del receptor GPIIb/IIIa unido de forma covalente, una composición de ADP y prostaglandina E1, y un tampón. La muestra del paciente es normalmente sangre entera citrada, que se dispensa automáticamente del tubo de recogida de sangre en el cartucho mediante el analizador, sin que sea necesario el manejo de sangre por parte del usuario. La interacción se monitoriza mediante las características de la absorbancia infrarroja de las partículas. Dado que las partículas interaccionan con las plaquetas, la aglutinación de las partículas se mide a través del sistema óptico del analizador Ultegra™. La aglutinación se detecta como un incremento en la transmisión de la luz infrarroja que atraviesa la muestra. La cinética de reacción se analiza y traduce en "Unidades de Respuesta P2Y12", PRU.

- [0046]** En otra realización de la presente invención hay un kit que incluye en la combinación envasada una preparación liofilizada que comprende partículas con fibrinógeno unido de forma covalente, una composición de ADP y prostaglandina E1, y un tampón. La preparación liofilizada se puede encontrar en un recipiente de reacción tal como un cartucho usado en el instrumento de análisis. Para el sistema Ultegra® mencionado anteriormente, la preparación liofilizada se puede colocar en los pocillos exteriores del cartucho de cuatro pocillos usado en el analizador. El kit puede incluir también un recipiente de recogida de muestra y/o un dispositivo para realizar el presente procedimiento. Las cantidades relativas de los reactivos se pueden variar de forma amplia para mantener las concentraciones de los reactivos en la disolución lo que optimiza de forma sustancial la sensibilidad de la determinación.
- 10 **[0047]** Cuando sea apropiado, los reactivos se pueden colocar en un envase hermético para mantener la actividad de los reactivos. El envase puede ser, por ejemplo, una bolsa, un estuche, o similares fabricados a partir de un material que sea sustancialmente no permeable a la humedad. Tales materiales incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, plástico, papel de aluminio, y similares. Para las muestras de sangre del kit puede incluir también un artículo para perforar la piel de una persona, apósitos desinfectantes o esterilizados, etcétera. El kit también puede
- 15 incluir calibradores y estándares. Además, el kit también puede incluir uno o más reactivos para realizar un ensayo de recuento plaquetario.

- [0048]** El kit puede incluir los reactivos necesarios para realizar el ensayo de la presente invención. En una realización, el kit incluye un vial de sangre, un tampón que mantiene el pH y la concentración salina de la muestra de sangre evaluado dentro de unos intervalos adecuados para la aglutinación mediada por las plaquetas de la superficie sólida y pequeñas perlas de polímero recubiertas con el ligando receptor GPIIb/IIIa de plaquetas. El tampón puede estar en disolución, o puede consistir únicamente en la composición de tampón y las sales a las cuales se añade una cantidad de agua conocida para conseguir la solución tampón deseada. De forma opcional, el kit puede también comprender un anticoagulante. En una realización, el tampón es HEPES; el anticoagulante es citrato; el ligando receptor GPIIb/IIIa es fibrinógeno; las pequeñas perlas de polímero son poliacrilonitrilo o poliestireno carboxilado en el que el péptido ligando receptor del GPIIb/IIIa, tal como el fibrinógeno, se une de forma covalente a la superficie de la perla por medio de un enlace covalente entre la parte N terminal del péptido y una N-hidroxisuccinimida o grupo carboxilato en la superficie de la perla. En una realización adicional, el kit comprende adicionalmente un activador plaquetario, tal como una composición de ADP y prostaglandina E1.
- 20
- 25

Ejemplos

- 30 **[0049]** Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y sin limitación. Las partes y porcentajes son en peso a menos que se indique lo contrario.

[0050] Los siguientes ejemplos y preparaciones tienen por objeto la ilustración de la invención pero no tienen por objeto limitar su alcance.

- [0051]** Los ensayos de respuesta de dosis se realizaron con ADP (Chronolog) y prostaglandina E1 (SIGMA) en concentraciones finales de 20 μM y 22 nM respectivamente. El ADP se diluyó en Hepes/Salino, tampón a pH 7,4 con una concentración final de 220 μM antes de su uso en el agregómetro. La prostaglandina E1 se diluyó en Hepes/Salino, tampón a pH 7,4 con una concentración final de 220 μM antes de su uso en el agregómetro. Un bloqueador del receptor P2Y12 se diluyó en DMF con unas concentraciones finales de 1 nM, 2mM y 5mM.
- 35

- [0052]** Se pipetearon cinco microlitros del compuesto P2Y12 diluido en 5 ml de sangre entera. Las muestras se invirtieron e incubaron durante una hora a temperatura ambiente. La muestra basal de sangre entera no recibió ningún aditivo. Una vez que se completó la incubación, las muestras de sangre entera se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos para el plasma rico en plaquetas (PRP) y a 3500 rpm durante 15 minutos para el plasma pobre en plaquetas (PPP). El recuento plaquetario se ajustó a aproximadamente 250.000/ μl para cada muestra usando PPP.
- 40

- [0053]** Para la agregometría, se añadieron 450 μl de PRP ajustado a una cubeta de vidrio. La muestra blanco contenía 450 μl de PPP y 50 μl de tampón Hepes/Salino. Se añadieron cincuenta microlitros de una composición de ADP 200 μM y de prostaglandina E1 220 nM a cada muestra de PRP y se ensayaron durante 10 minutos en el agregómetro.
- 45

Resultados

- 50 **[0054]** Como se ilustra en la Figura 3, los reactivos y el sistema descritos anteriormente detectan con éxito la extensión de la agregación plaquetaria a partir de una muestra de sangre tratada con un antagonista P2Y12. Las Figuras 1 y 2 ilustran la respuesta media de un individuo y de cinco individuos, respectivamente.

- [0055]** Es evidente a partir de los resultados anteriormente ilustrados en la Figura 3, que mediante la presente invención se proporciona un procedimiento rápido y simple para realizar un ensayo de la actividad plaquetaria en muestras que se han afectado por la exposición a un antagonista P2Y12.
- 55

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir la inhibición de la agregación plaquetaria mediante un antagonista P2Y12, que comprende las etapas de:
 - 5 a) proporcionar una muestra de sangre que contenga plaquetas de un individuo tratado con un antagonista P2Y12;
 - b) poner en contacto dicha muestra de sangre que contiene plaquetas con partículas que comprenden un ligando receptor GPIIb/IIIa unido, adenosina difosfato (ADP) y prostaglandina E1 (PGE1) en condiciones adecuadas para la aglutinación de dichas partículas mediada por dichas plaquetas en dicha muestra de sangre; y
 - 10 c) evaluar dicha aglutinación para determinar el nivel de inhibición de agregación plaquetaria de dicho antagonista P2Y12 en dicho individuo, en el que dicho nivel de aglutinación indica si dicho individuo tiene una capacidad reducida para producir agregación plaquetaria en respuesta a dicho tratamiento con el antagonista P2Y12.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ADP tiene una concentración final de 2 a 35 µM.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ADP tiene una concentración final de 15 a 20 µM.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha PGE1 tiene una concentración final de 2 a 30 nM.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la PGE1 tiene una concentración final de 20 a 25 nM.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho antagonista P2Y12 es una tienopiridina.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicha tienopiridina es clopidogrel.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicha tienopiridina es ticlopidina.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de sangre que contiene plaquetas proviene de un individuo tratado con un antagonista P2Y12 y aspirina.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas partículas comprenden poliestireno o látex.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas partículas comprenden un colorante infrarrojo, el
 25 contacto entre la muestra de sangre que contiene plaquetas y las partículas forma una mezcla de ensayo, la aglutinación de dichas partículas mediada por dichas plaquetas que se evalúa mediante la irradiación de dicha mezcla de ensayo con una luz del espectro infrarrojo, y la evaluación de la transmisión de la luz infrarroja de dicha mezcla de ensayo.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ligando receptor GPIIb/IIIa comprende una sustancia
 30 seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, anticuerpo monoclonal 10E5, anticuerpo monoclonal c7E3, factor von Willebrand, fibronectina, vitronectina, un ligando que tenga la secuencia arginina – glicina - ácido aspártico (RGD) y un péptido o un péptido mimético que imita la secuencia RGD.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el ligando receptor GPIIb/IIIa es fibrinógeno.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, que se realiza a una temperatura en el rango de 30 °C a 40 °C, y el
 35 tiempo total de las lecturas a partir del momento del contacto entre la muestra de sangre que contiene plaquetas, las partículas que comprenden el ligando receptor GPIIb/IIIa unido, ADP y PGE1 se encuentra en el rango de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre que contiene plaquetas es una muestra de sangre entera.
- 40 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre que contiene plaquetas es una muestra de plasma.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las partículas, el ADP y la PGE1 están contenidas en un medio de ensayo.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el medio de ensayo tiene un pico de absorción a
 45 aproximadamente 800 nm.

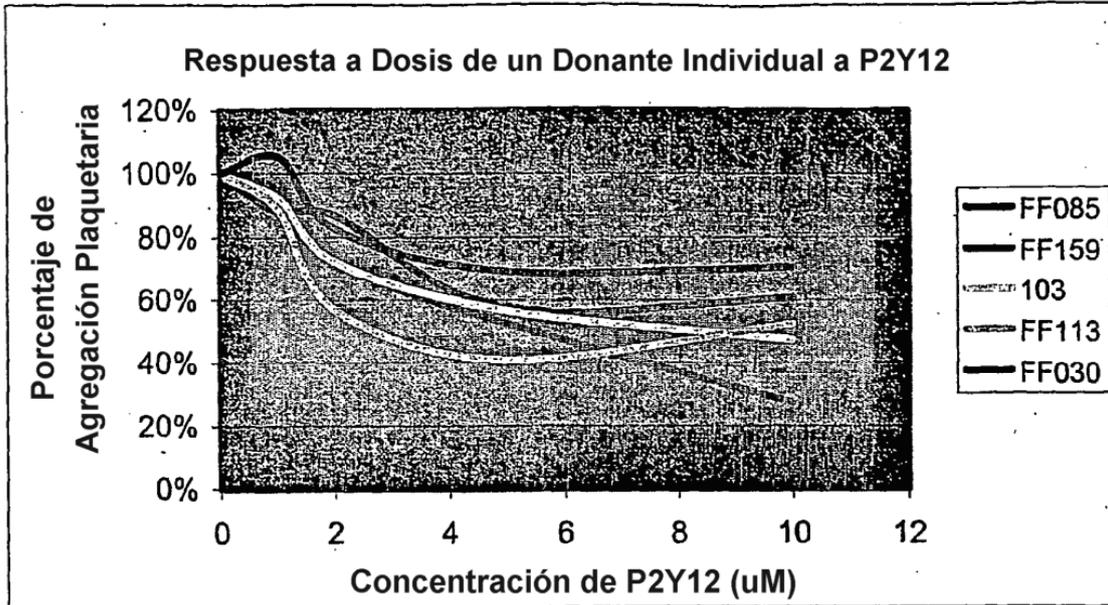


Fig. 1

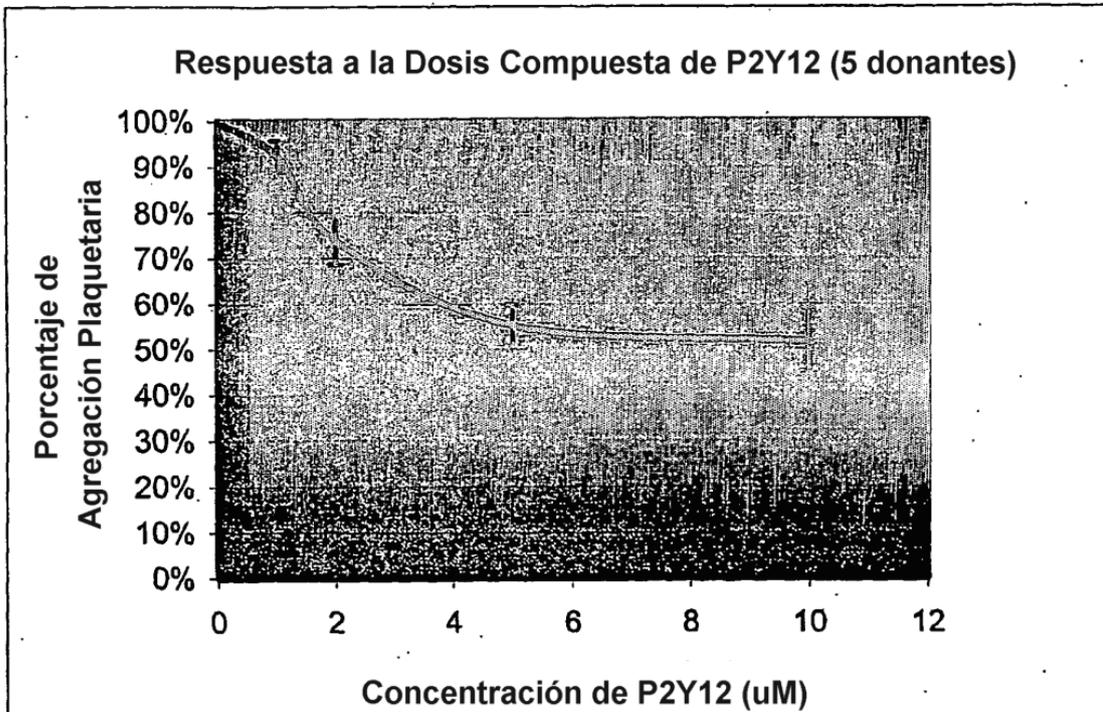
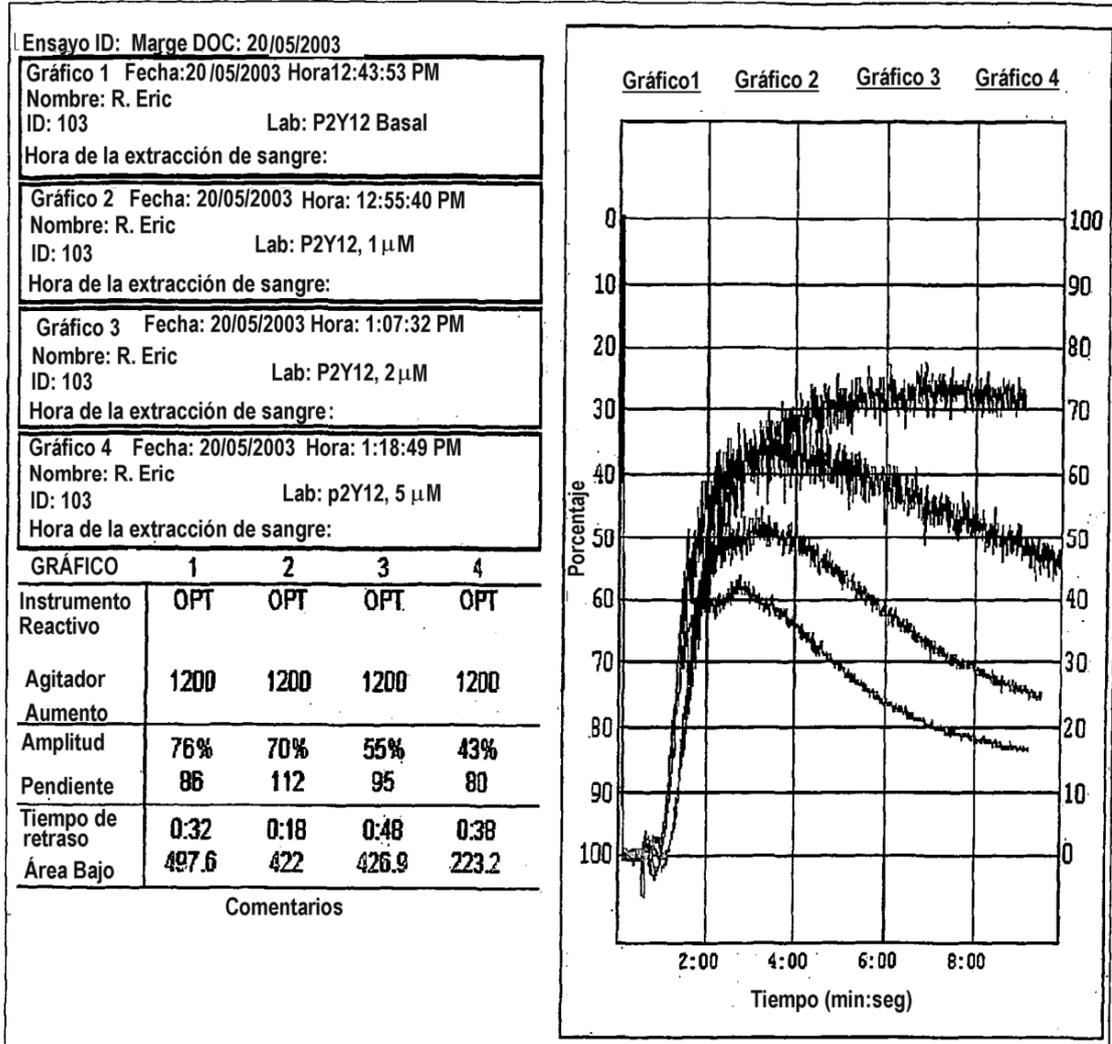


Fig. 2

Fig. 3



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.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5763199 A, Coller [0007]
- US 17788498 A [0043]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

10

- **MULLER I ; BESTA F ; SCHULZ C ; MASSBERG S ; SCHONIG A ; GAWAZ M.** Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placemen. *Thromb Haemost.*, May 2003, vol. 89 (5), 783-7 [0008]
- **COLLER et al.** *J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 72, 325 [0022]
- The EPIC Investigators. *N.E. Journal of Med.*, 1994, vol. 330, 956 [0022]
- **COOK et al.** *Drugs of the Future*, 1994, vol. 19, 135 [0022]
- **ICHIRO CHIBATA.** Immobilized Enzymes. Halsted Press, 1978 [0025]
- **CUATRECASAS.** *J. Biol. Chem.*, 1970, vol. 245, 3059 [0025]

15