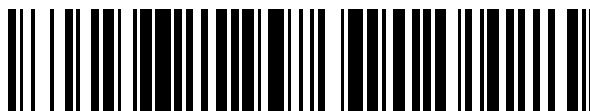


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 651**

51 Int. Cl.:
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07799096 .8**
96 Fecha de presentación: **27.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2044212**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54 Título: **Métodos para identificar pacientes con riesgo aumentado de un acontecimiento cardiovascular adverso**

30 Prioridad:
07.07.2006 US 483028

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.07.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:
CHRISTIE, Douglas J.

74 Agente/Representante:
Zuazo Araluze, Alexander

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).

ES 2 384 651 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos para identificar pacientes con riesgo aumentado de un acontecimiento cardiovascular adverso.

Antecedentes

Esta invención se refiere a métodos para identificar pacientes con riesgo aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso. La invención también se refiere a la determinación de hiperactividad plaquetaria en un paciente que está sometiéndose a terapia anti-plaquetaria con aspirina como una indicación de un riesgo aumentado de padecer un acontecimiento cardiovascular.

El término "enfermedad cardiovascular" se refiere a una clase de enfermedades que involucran al corazón y/o vasos sanguíneos (arterias y venas), es decir, cualquier enfermedad que afecta al sistema cardiovascular. Más de cincuenta millones de norteamericanos tienen problemas cardiovasculares, y la mayoría de los demás países occidentales se enfrentan a tasas elevadas y crecientes de enfermedad cardiovascular. Es la causa número uno de fallecimiento e incapacidad en los Estados Unidos y la mayoría de países europeos.

El papel de las plaquetas en la fisiología de mamíferos es extraordinariamente diverso, pero su papel principal es promover la hemostasia. Cuando se exponen a un vaso sanguíneo dañado, las plaquetas se adherirán a una matriz subendotelial expuesta. Tras la adhesión inicial, diversos factores liberados en el sitio de la lesión tales como trombina, ADP y colágeno activan las plaquetas. Una vez que se activan las plaquetas, se produce un cambio conformacional en el receptor plaquetario de glicoproteínas GPIIb/IIIa que le permite unirse a fibrinógeno y/o factor de von Willebrand. Es esta unión de moléculas de factor de von Willebrand y/o de fibrinógeno multivalente por receptores GPIIb/IIIa en plaquetas adyacentes lo que da como resultado el reclutamiento de plaquetas adicionales en el sitio de la lesión y su agregación para formar un trombo hemostático.

Preguntas de interés incluyen si se deben administrar fármacos que bloqueen, o promuevan, la formación de coágulos, o si se deben detectar deficiencias en la función plaquetaria antes de intervenciones quirúrgicas. Se sabe que las plaquetas desempeñan un papel activo en el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV). Por consiguiente, son extremadamente importantes las estrategias terapéuticas para inhibir la función plaquetaria.

Millones de personas están tomando aspirina, el agente inhibidor plaquetario más antiguo y más ampliamente usado, como terapia para reducir el riesgo de ataques al corazón y otros acontecimientos cardiovasculares. Esto incluye personas que han padecido previamente un acontecimiento cardiovascular así como aquéllos con colesterol elevado, una historia familiar de enfermedad cardíaca, u otros factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. Entre aquéllos con factores de riesgo, a muchas personas que han tenido un ataque al corazón u otro acontecimiento cardiovascular se les prescribe algún agente antiplaquetario, habitualmente aspirina. La aspirina (ácido acetilsalicílico) reduce eficazmente el riesgo de acontecimientos trombóticos secundarios en individuos que han experimentado angina, infarto de miocardio, arteriopatía periférica o isquemia cerebrovascular. La aspirina también puede reducir el riesgo de acontecimientos trombóticos iniciales en individuos sanos y muchas personas sanas sin un riesgo elevado reconocido de enfermedad cardiovascular también toman aspirina como precaución. Por este motivo, muchos individuos, a través de prescripciones médicas o automedicación, toman aspirina regularmente para la prevención primaria o secundaria de enfermedad trombótica.

Sin embargo, se sabe que la aspirina reduce los acontecimientos vasculares isquémicos en sólo aproximadamente el 22%. La escasa capacidad de respuesta a la aspirina, tal como se mide mediante diversas pruebas de laboratorio, se asocia con trastornos isquémicos vasculares, incluyendo infarto de miocardio, arteriopatía coronaria y accidente cerebrovascular.

Sería deseable, por tanto, poder determinar la probabilidad de que un paciente que está sometiéndose a terapia con aspirina experimente un acontecimiento cardiovascular adverso. Sería deseable identificar los pacientes con riesgo aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso importante incluso mientras están sometiéndose a terapia con aspirina. La capacidad para identificar individuos de alto riesgo permitiría a los médicos centrarse en medidas preventivas en esos individuos, que pueden obtener el mayor beneficio, y que proporcionaría fuertes incentivos para aquéllos en riesgo para cumplir con tales enfoques.

Sumario

Un aspecto de la presente invención es un método para identificar un paciente con un riesgo aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso en el que el paciente está sometiéndose a terapia antiplaquetaria con aspirina y es sensible a la aspirina. Se evalúa una muestra que contiene plaquetas del paciente para determinar hiperactividad plaquetaria y se relaciona la hiperactividad plaquetaria en la muestra con el riesgo del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso.

Otra realización según la presente invención se refiere a un método para evaluar el riesgo de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso en un paciente que está sometiéndose a terapia antiplaquetaria con aspirina y es sensible a la aspirina. Se extrae a vacío una muestra que contiene plaquetas del paciente a través de un capilar de modo que entra en contacto con una membrana que comprende una abertura y se activan las plaquetas en la

muestra por medio de fuerza de cizallamiento. La membrana comprende un estimulador de la agregación plaquetaria. Se determina el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario que bloquee la abertura de la membrana y se relaciona el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario con el riesgo del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso.

- 5 Otra realización según la presente invención es un método para evaluar el riesgo de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso en un paciente que está sometiéndose a terapia antiplaquetaria con aspirina y es sensible a la aspirina. Se extrae a vacío una muestra de sangre completa del paciente a través de un capilar de modo que entra en contacto con una membrana que comprende una abertura y se activan las plaquetas en la muestra por medio de fuerza de cizallamiento, en el que la membrana comprende un estimulador de la agregación plaquetaria.
- 10 Se mide el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario que bloquee la abertura de la membrana y se relaciona con el riesgo del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso en el que el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario se compara con un tiempo predeterminado. Un tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario menor que el tiempo predeterminado es indicativo de un riesgo aumentado del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gráfico de sensibilidad-especificidad que representa los resultados de la prueba de función plaquetaria frente al criterio de valoración compuesto de fallecimiento, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular en pacientes sensibles a la aspirina con enfermedad cardiovascular estable.

Descripción de realizaciones específicas

- 20 Tal como se mencionó anteriormente, en una realización, la presente invención se refiere a métodos para identificar un paciente que tiene un riesgo aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso. Los pacientes en cuestión son aquéllos que están sometiéndose a terapia antiplaquetaria con administración de aspirina. Se evalúa una muestra que contiene plaquetas del paciente para determinar hiperactividad plaquetaria. Los resultados de la evaluación se emplean para evaluar el riesgo del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso. En general, la hiperactividad plaquetaria en la muestra es una indicación de un riesgo
- 25 aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso. Normalmente, la evaluación se lleva a cabo en condiciones de alto cizallamiento en presencia de un estimulador de la agregación plaquetaria.

- Los acontecimientos cardiovasculares adversos incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, acontecimientos trombóticos arteriales o trastornos isquémicos vasculares, incluyendo infarto de miocardio, arteriopatía coronaria, accidente cerebrovascular, angina (estable e inestable), arteriopatía periférica, isquemia cerebrovascular.
- 30

- Los pacientes que están sometiéndose a terapia con aspirina son aquellos pacientes que están tratándose con una cantidad eficaz de aspirina, es decir, una cantidad suficiente o eficaz para reducir la incidencia de acontecimientos trombóticos arteriales y/o para prevenir infarto de miocardio, enfermedad trombótica cerebrovascular y fallecimiento vascular en individuos con angina estable, angina inestable, infarto de miocardio, isquemia cerebral transitoria, enfermedad vascular periférica, accidente cerebrovascular trombótico, y similares. Dosis normales para la terapia con aspirina pueden ser de entre 30 y 325 mg/día.
- 35

- Se evalúa una muestra que contiene plaquetas de un paciente que está sometiéndose a terapia antiplaquetaria para determinar hiperactividad plaquetaria. La muestra que contiene plaquetas es cualquier muestra del paciente que contenga plaquetas que pueden evaluarse para determinar hiperactividad. En muchos casos, la muestra es sangre completa o plasma rico en plaquetas. La forma particular de la muestra que contiene plaquetas puede variar dependiendo de la naturaleza del método para determinar la hiperactividad plaquetaria.
- 40

- La hiperactividad plaquetaria en el contexto de la presente descripción significa que el tiempo hasta la formación del trombo plaquetario en muestras que contienen plaquetas de un paciente dado está por debajo de un valor de corte establecido tal como se determina a partir de un gráfico de sensibilidad-especificidad tal como se muestra en la figura 1.
- 45

- En el ejemplo de la figura 1, la hiperactividad plaquetaria se define mediante un tiempo hasta la formación del trombo plaquetario menor que 90 segundos. La magnitud con la que las plaquetas muestran hiperactividad está relacionada con el riesgo de que un paciente experimente un acontecimiento cardiovascular adverso. Generalmente, la hiperactividad plaquetaria, que tiene un tiempo hasta la formación del trombo plaquetario menor que 90 segundos, significa que el paciente tiene un riesgo aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular futuro de 4 a 7 veces más probable que si el tiempo hasta la formación de trombo plaquetario es mayor que o igual a 90 segundos.
- 50

- En algunas realizaciones, se evalúa la hiperactividad plaquetaria usando un método de prueba de alta fuerza de cizallamiento o prueba de función plaquetaria de alto cizallamiento. En algunas realizaciones de tal método, se extrae a vacío una muestra que contiene plaquetas de un paciente a través de un capilar y se activan las plaquetas por medio de fuerza de cizallamiento. El capilar se define mediante su dimensión y es generalmente un canal que tiene una dimensión capilar, es decir, un área de la sección transversal que proporciona flujo capilar a través del
- 55

canal. Al menos una de las dimensiones de la sección transversal, por ejemplo, anchura, altura, diámetro, es al menos de aproximadamente 1 μm , o al menos de aproximadamente 10 μm , y habitualmente no es mayor que aproximadamente 500 μm , o no es mayor que aproximadamente 200 μm . Los canales de dimensión capilar tienen normalmente un diámetro de orificio interno (DI) de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 300 micrómetros, o desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 micrómetros, o desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 100 micrómetros.

El capilar se fabrica de un material que es rígido o flexible, transparente u opaco. Plásticos particulares que encuentran uso para la fabricación del capilar incluyen, por ejemplo, formas flexibles o rígidas de polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), por ejemplo, TEFLON[®], poli(metacrilato de metilo), policarbonato, poli(tereftalato de etileno), copolímeros de estireno o poliestireno, poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietilenaminas, poli(sulfuros de arileno), polisiloxanos, polidimetilsiloxanos, poliimidas, poliacetatos, polieteretercetona (PEEK), y similares, o bien usados solos o bien junto con otro material o materiales.

Los materiales rígidos adecuados pueden incluir, por ejemplo, vidrio (término que se usa para incluir sílice), por ejemplo, Bioglass, y resinas y plásticos rígidos, metales tales como, por ejemplo, acero inoxidable, etcétera. Los plásticos rígidos incluyen, por ejemplo, polímeros tales como, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc., o bien usados por sí mismos o bien junto con otros materiales. El material elegido no debe ser reactivo con las muestras o los reactivos aplicados al capilar.

La presión negativa o el vacío aplicado al capilar es generalmente el que es eficaz o suficiente para someter la muestra a alta fuerza de cizallamiento. El término "alta fuerza de cizallamiento" para los fines de la presente descripción significa de aproximadamente 5000 a aproximadamente 6000 segundos⁻¹ o más. Normalmente, las fuerzas de cizallamiento son aquéllas que son similares a las fuerzas de cizallamiento de las arterias y vasos sanguíneos parcialmente ocluidos. El vacío es habitualmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 kPa, de aproximadamente 2 a aproximadamente 9 kPa, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 kPa, de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 kPa o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 kPa.

Como resultado de someterse a una alta fuerza de cizallamiento en el capilar, se activan las plaquetas. La activación de las plaquetas significa que se produce un cambio conformacional en el receptor plaquetario de glicoproteínas IIb/IIIa que le permite unirse a fibrinógeno y/o factor de von Willebrand. Es esta unión de moléculas de factor de von Willebrand y/o de fibrinógeno multivalente por receptores GPIIb/IIIa en plaquetas adyacentes lo que da como resultado el reclutamiento de plaquetas adicionales en el sitio de la lesión y su agregación para formar un trombo hemostático.

En algunas realizaciones, se dispone un elemento con respecto a una abertura del capilar. En muchas realizaciones, el elemento es absorbente de líquidos de modo que pueden incorporarse en el mismo agentes que pueden iniciar el proceso de coagulación sanguínea o la agregación plaquetaria en la sangre. El elemento también puede tener una estructura estable de modo que puede colocarse una abertura precisa a través del elemento tal como, por ejemplo, punzonándose a través del elemento. El elemento en algunas realizaciones también puede servir como matriz de soporte para un reactivo tal como, por ejemplo, un estimulador de la agregación plaquetaria, por ejemplo colágeno.

Tal como se mencionó anteriormente, el elemento puede ser absorbente y por tanto puede ser un elemento poroso. El tamaño de poro en elementos porosos preferidos es tal que los agentes pueden penetrar por el elemento y no existe interferencia con la creación de una presión negativa, por ejemplo, en un dispositivo de prueba, con el fin de aspirar sangre a través de una abertura en el elemento tal como se comenta a continuación en el presente documento. El tamaño de poro también se selecciona de modo que no penetre sustancialmente sangre completa en el elemento sino que más bien pase a través de una abertura en la membrana tal como se comenta a continuación.

El elemento puede disponerse con respecto al capilar de manera que una superficie del elemento correspondiente a una dimensión principal del elemento sea sustancialmente transversal al flujo de la muestra en el capilar. El término "sustancialmente transversal" significa que la superficie del elemento está dentro de aproximadamente 20 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente 15 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente 10 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente 5 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente 4 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente 3 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente 2 grados con respecto a la perpendicular, dentro de aproximadamente un grado con respecto a la perpendicular, o perpendicular al eje correspondiente a la dirección de flujo de la muestra en el capilar. La ubicación del elemento con respecto al capilar depende de varios factores tales como, por ejemplo, la longitud del capilar, el diámetro de la abertura, la naturaleza de la muestra, y similares. En algunas realizaciones, el elemento se localiza adyacente a una salida del capilar, es decir, una abertura del capilar a través de la cual sale la muestra del capilar.

En algunas realizaciones, el elemento comprende una membrana. En algunas realizaciones, tal como se mencionó anteriormente, la membrana comprende una abertura, a través de la cual puede fluir la muestra que sale del capilar. El tamaño de la abertura en la membrana depende de varias consideraciones. Las dimensiones de la abertura se eligen de manera que en las condiciones del ensayo en particular se formará un trombo y se cerrará la abertura. La

abertura no debe ser tan pequeña que se produzcan bloqueos no relacionados con el ensayo. La abertura no debe ser tan grande para que no se forme apropiadamente un trombo. Para la prueba de función plaquetaria comentada en el presente documento, la abertura es de entre aproximadamente 100 micrómetros y aproximadamente 200 micrómetros, o de aproximadamente 140 micrómetros a 160 micrómetros, o de aproximadamente 150 micrómetros.

5 La dimensión de la abertura en el elemento no tiene una gran influencia sobre las características de flujo inicial en un dispositivo. Generalmente, el único paso para que salga la muestra del capilar es a través de la abertura en la membrana.

Las dimensiones de la membrana son tales que el diámetro de la membrana es al menos suficiente para proporcionar adecuadamente la formación de, y la presencia de, una abertura tal como se comentó anteriormente. Además, tal como se comenta a continuación, la membrana puede comprender un estimulador de la agregación plaquetaria incorporado en la misma o sobre la misma. Por consiguiente, el diámetro y grosor de la membrana depende de la cantidad del estimulador de la agregación plaquetaria empleado en una prueba particular. Las dimensiones de la membrana deben ser tales que la membrana pueda comprender una cantidad suficiente del estimulador de la agregación plaquetaria.

15 Los elementos porosos proporcionan una matriz de soporte para el agente o agentes que promueven la formación de coágulos o la coagulación sanguínea. En algunas realizaciones, el elemento poroso tiene absorbencia de líquidos de modo que pueden incorporarse reactivos en el mismo, sin embargo tiene una estructura estable de modo que puede, por ejemplo, punzonarse en el mismo una abertura precisa. El elemento poroso se fabrica de un material que puede mantener el tamaño de la abertura en el mismo incluso cuando se humecta. El material debe ser relativamente inerte a los agentes usados en la prueba y no debe provocar activación interferente de plaquetas o de las rutas. Debe ser también insensible a la temperatura de la prueba, por ejemplo, aproximadamente 37°C. La membrana puede fabricarse de, por ejemplo, ésteres de celulosa tales como, por ejemplo, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, y similares, cerámicas, polímeros tales como, por ejemplo, nailon, polipropileno, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), y similares, vidrio tal como, por ejemplo, fibra de vidrio, etcétera. En algunas realizaciones, la membrana es una membrana de éster mixto (acetato y nitrato) de celulosa de Millipore Corp., Bedford, MA.

Los elementos porosos tienen habitualmente incorporados en los mismos, agentes que permiten una evaluación directa y completa de la función plaquetaria y factores de coagulación de la sangre. En muchas realizaciones, una membrana comprende un estimulador de la agregación plaquetaria, que es un agente que promueve la agregación de las plaquetas. Se sabe que las plaquetas se agregan en una variedad de condiciones y en presencia de varios reactivos diferentes. La agregación plaquetaria es un término usado para describir la unión de las plaquetas entre sí. El fenómeno puede inducirse añadiendo agentes de inducción de agregación a plasma rico en plaquetas (PRP) o a sangre completa. La agregación plaquetaria *in vitro* depende de la capacidad de las plaquetas para unir fibrinógeno y/o factor de von Willebrand a sus superficies después de la activación mediante un agente de inducción de agregación tal como ADP o colágeno.

35 Los ejemplos de estimuladores de la agregación plaquetaria adecuados que pueden emplearse en los presentes métodos incluyen colágeno, ristocetina, ácido araquidónico y las sales del mismo, serotonina, adenosina-5'-difosfato, epinefrina, trombina, factor activador de plaquetas (PAF), péptido agonista del receptor de trombina (TRAP), y similares o combinaciones de los mismos tales como, por ejemplo, colágeno y adenosina-5'-difosfato, colágeno y epinefrina, y similares.

40 El estimulador de la agregación plaquetaria se une a o dentro de la membrana habitualmente por difusión. En algunas realizaciones, el estimulador de la agregación plaquetaria se une a la membrana de manera no covalente tal como, por ejemplo, por medio de adsorción, absorción, absorción y secado, etcétera. En una realización, se pone en contacto una disolución de estimulador de la agregación plaquetaria con la membrana para permitir que los poros de la membrana se absorban con la disolución. Entonces se retira la membrana del contacto con la disolución y se seca.

La cantidad del estimulador de la agregación plaquetaria en la membrana es la que es eficaz o suficiente para promover la agregación de las plaquetas en la muestra en las condiciones de los presentes métodos. La cantidad empleada depende de la naturaleza del estimulador de la agregación plaquetaria, la naturaleza de la muestra y similares. La cantidad de estimulador de la agregación plaquetaria es de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 70 µg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 60 µg o de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 50 µg, y similares. En una realización, la membrana comprende 50 µg de adenosina-5'-difosfato y aproximadamente 2 µg de colágeno. Por "unido por difusión" se quiere decir que el estimulador de la agregación plaquetaria se une a la membrana de modo que se retire de la membrana durante el presente método, habitualmente, tras el contacto con, o la exposición a, una muestra que está sometándose a prueba. El estimulador de la agregación plaquetaria puede incorporarse en la membrana como resultado de capacidad habilidad para penetrar en la membrana y, en algunas realizaciones, saturar la membrana, formando de ese modo una película sobre la membrana así como incorporándose en la misma.

El método de prueba de la alta fuerza de cizallamiento o prueba de función plaquetaria de alto cizallamiento se lleva a cabo habitualmente a temperaturas moderadas tales como por ejemplo, de aproximadamente 25 a

aproximadamente 45°C, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 37 a aproximadamente 38°C, etcétera.

Se mide el tiempo que lleva formar, es decir, el tiempo hasta la formación de, un trombo plaquetario que bloquea la abertura y se relaciona con la hiperactividad de las plaquetas y, en última instancia, con el riesgo de un paciente que está sometiéndose a terapia antiplaquetaria con aspirina de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso. En algunas realizaciones, se considera que la abertura está bloqueada cuando el flujo sanguíneo a través del capilar se ha reducido hasta el 10% de su flujo inicial. El periodo de tiempo se mide generalmente desde el punto de aplicación de vacío al capilar hasta el punto de formación de un trombo plaquetario que bloquea la abertura. En algunas realizaciones, este periodo de tiempo se denomina el tiempo de cierre.

En algunas realizaciones, el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario se compara con un tiempo predeterminado, y un tiempo hasta la formación del trombo plaquetario que es menor que el tiempo predeterminado es indicativo de un riesgo aumentado del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso. En algunas realizaciones, el tiempo predeterminado se establece tal como sigue: se realizan pruebas de función plaquetaria con muestras de sangre de pacientes que toman aspirina y que tienen enfermedad cardiovascular. Usando los resultados de las pruebas de función plaquetaria e información de acontecimientos adversos recogida en la misma población de pacientes a lo largo de un periodo de tiempo de seis meses, un año o más, se construye un gráfico de sensibilidad-especificidad tal como se muestra en la figura 1 usando análisis de la curva receptor-operador (ROC). A partir de la curva ROC, se traza una línea desde el punto denominado "perfecto" hasta el punto más cercano en la curva. Este punto en la curva define el valor de corte óptimo o punto de decisión o tiempo predeterminado de la prueba. En algunas realizaciones, la magnitud del riesgo de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso está directamente relacionada con la magnitud en la que el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario es menor que el tiempo predeterminado.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo usando un aparato y los reactivos descritos en la patente estadounidense n.º 5.854.076. En las realizaciones de la patente anterior, el capilar y la membrana están presentes en un cartucho de prueba, que comprende un alojamiento que define una cámara de retención y una cámara de prueba. El alojamiento puede incluir una pestaña, una lengüeta y un sello superior retirable, que en el dispositivo montado se sella herméticamente a la pestaña y se cierra en la parte inferior con un sello inferior. La cámara de prueba está adaptada para recibir un recipiente de muestra. El recipiente de muestra soporta un elemento poroso tratado con reactivo que tiene una abertura en el mismo y un centro capilar que proporciona un mecanismo para conectar operativamente el capilar al recipiente de muestra. El interior del recipiente de muestra puede dotarse de medios de posicionamiento tales como nervaduras de tope de soporte de vacío para el posicionamiento. El alojamiento está adaptado para acoplarse con un instrumento que puede crear una presión negativa en la cámara de prueba o en una parte de la cámara de prueba. En una realización, esto se logra mediante un reborde de un recipiente de muestra, que comprende una parte de la cámara de prueba. El instrumento tiene un componente de acoplamiento, que puede acoplarse de manera sellable con el reborde del recipiente de muestra. El componente de acoplamiento puede comprender un soporte de vacío dotado de junta tórica, que durante un ensayo se encuentra de manera sellable con el reborde. El soporte de vacío se mueve por el instrumento para entrar en contacto con el reborde y ejercer una presión descendente sobre el recipiente de muestra para mover un capilar hacia un elemento perforable, haciendo que perfora el elemento perforable y se extienda en una muestra en la cámara de retención. Las nervaduras de tope en el recipiente de muestra del soporte de vacío limitan el movimiento descendente del soporte de vacío. Se hace que fluya muestra desde la cámara de retención hasta la cámara de prueba mediante la presión negativa creada por el instrumento.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo usando el sistema PFA-100® (Dade Behring Inc., Deerfield, IL), que es un instrumento y sistema de cartucho de prueba en el que se simula *in vitro* el proceso de adhesión y agregación plaquetarias tras una lesión vascular. Este sistema permite una evaluación rápida de la función plaquetaria en muestras de sangre completa anticoagulada. Las membranas que consisten en colágeno/epinefrina (CEPI) y colágeno/adenosina-5'-difosfato (CADP) y las altas velocidades de cizallamiento generadas en condiciones de flujo normalizadas, dan como resultado la unión, activación y agregación plaquetarias, construyendo un trombo plaquetario estable en la abertura de la membrana. El tiempo requerido para obtener una oclusión total de la abertura se notifica como el tiempo de cierre (CT) en segundos.

Pueden emplearse kits para llevar a cabo cualquiera de los métodos anteriores. En el kit, los reactivos pueden proporcionarse en combinación envasada en el mismo recipiente o en recipientes separados, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos, de modo que la razón de reactivos proporciona una optimización sustancial de una señal a partir de la molécula indicadora usada en el sistema de detección. El kit de diagnóstico puede comprender en combinación envasada uno o más cartuchos de prueba que comprenden un capilar y una membrana tal como se comentó anteriormente. El kit también puede incluir otros reactivos tal como pueden emplearse en las pruebas.

Ejemplos

La invención se demuestra además mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. Las temperaturas están en grados

centígrados y las partes y los porcentajes usados en esta descripción son en peso a menos que se especifique lo contrario.

Métodos

5 Grupo de pacientes: se estudiaron un total de 326 pacientes consecutivos, que tenían todos ellos enfermedad cardiovascular estable y estaban tomando 325 mg de aspirina/día durante al menos 7 días. De los 326 pacientes, 315 estuvieron disponibles para el seguimiento. El centro de esta investigación estaba dirigido únicamente a aquellos pacientes para los que se consideró eficaz la terapia con aspirina usando agregación óptica tal como se definió en Gum, *et al.* [ácido araquidónico 0,5 mg/ml <20% y ADP 10 μ M <70%]. Mediante estos criterios, se incluyeron 299 pacientes en el presente estudio. Sin embargo, sólo 296 pacientes tenían cantidades suficientes de sangre completa disponible para llevar a cabo las pruebas PFA-100. Previamente se notificaron detalles completos de este grupo de pacientes (Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2001; 88:230-5. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41:961-5).

10 Se proporciona la información demográfica pertinente en la tabla 1 (a continuación). El estudio se aprobó por la junta de revisión institucional y todos los pacientes dieron su consentimiento informado. Es importante observar que, aunque se usó la base de datos anterior de Gum *et al.* en los estudios citados anteriormente, los presentes métodos y estudios no se dan a conocer ni sugieren en Gum.

20 Muestras de sangre y pruebas de función plaquetaria: Se extrajo sangre completa en citrato de sodio tamponado al 3,8% y se llevaron a cabo las pruebas tal como se describió anteriormente. Brevemente, se llevaron a cabo pruebas de función plaquetaria de alto cizallamiento por duplicado con el PFA-100 (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania; empleado como un dispositivo de investigación en este grupo de paciente) usando el cartucho CADP. Se usaron los resultados medios de las mediciones por duplicado en el análisis de datos.

25 Análisis estadístico del desenlace clínico: Se determinaron las diferencias en las características iniciales entre hipersensibilidad positiva y negativa de plaquetas a grupos ADP (HSPA) (véase a continuación) mediante análisis de chi-cuadrado para determinar desenlaces dicotómicos. Para determinar desenlaces continuos, se realizó una prueba de la t de Student. Se obtuvo un promedio de seguimiento de 22 meses en los pacientes incluidos en el estudio. Se usaron curvas de características operativas del receptor (ROC) para generar umbrales de decisión (valores de corte clínico) para las pruebas de función plaquetaria. El mejor rendimiento clínico del ensayo se determina hallando el punto en la curva que está más cerca de una prueba "perfecta" (véase la figura 1). Esto condujo a la definición de HSPA como un paciente que tiene un CADP CT <90 segundos (tabla 1). Luego se calcularon los valores de riesgo relativo (RR) para los acontecimientos compuestos y los acontecimientos de componente individual. Se usó la regresión de Poisson para ajustar por los efectos de factores de riesgo concomitantes y evaluar el estado de HSPA como un factor pronóstico independiente del desenlace compuesto de fallecimiento, IM o ACV, así como los componentes individuales. Se eligió la regresión de Poisson para este fin ya que permite la presentación de los resultados en cuanto a RR.

Tabla 1. Características demográficas de pacientes sensibles a la aspirina por estado de HSPA

	HSPA positiva† (125/296)	HSPA negativa (171/296)	Valor de p
Factores Clínicos*			
Edad (años)	60 $\pm$ 10	61 $\pm$ 10	0,706
Sexo (% masculino)	76,8	79,4	0,591
Tabaquismo (%)	66,1	74,2	0,102
Diabetes (%)	32,0	29,2	0,610
CABG anterior (%)	43,2	36,3	0,227
ICP anterior (%)	38,4	33,9	0,427
IM anterior (%)	47,2	37,4	0,092

ACV anterior (%)	7,2	3,5	0,153
ICC (%)	10,4	2,9	0,008
Valores de laboratorio			
Hemoglobina (g/dl)	14 ± 2	14 ± 1	0,746
Recuento de plaquetas (x 10 ³ /μl)	217 ± 71	194 ± 64	0,003
Ticlopidina/clopidogrel (%)			
Fallecimiento/IM/ACV	19,2	5,3	<0,001
Fallecimiento (%)	11,2	1,8	0,001
IM (%)	6,4	4,1	0,372
ACV (%)	4,0	0,6	0,040

*ASA = aspirina; CABG = revascularización coronaria; ICC = insuficiencia cardíaca congestiva; ACV = accidente cerebrovascular; IM = infarto de miocardio; ICP = intervención coronaria percutánea.

†Definido por CADP CT <90 segundos.

Resultados

Criterios para HSPA: Mediante el análisis de ROC, CADP CT se correlacionó significativamente con el criterio de valoración compuesto de fallecimiento, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular ($p < 0,0001$, figura 1). El corte establecido por el análisis de ROC para HSPA fue un CADP CT <90 segundos.

- 5 Prevalencia de HSPA asociada con acontecimientos clínicos importantes: Los pacientes con HSPA (125/296 = 42,2%) tuvieron una tasa de criterio de valoración compuesto del 19,2% (24/125) mientras que los pacientes sin HSPA (171/296 = 57,8%) sólo experimentaron acontecimientos a una tasa del 5,3% (9/171).

- 10 Riesgo futuro de experimentar un acontecimiento clínico importante: Los pacientes con HSPA tuvieron un RR de 3,65 (I.C. del 95%: 1,76 – 7,57) para el criterio de valoración compuesto (tabla 2). El RR aumentó hasta 6,56 (I.C. del 95%: 1,93 – 22,35) para aquellos pacientes que fallecieron en comparación con pacientes con CADP CT ≥90 segundos. Los valores de RR en este subgrupo para agregometría con ADP 10 μM oscilaron entre 1,05 y 4,95 para el criterio de valoración compuesto y los acontecimientos individuales de fallecimiento, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, pero no fueron estadísticamente significativos.

- 15 Tabla 2. Riesgo aumentado de experimentar acontecimientos clínicos adversos importantes tal como se evalúa mediante pruebas de función plaquetaria.

Desenlace	Grupo	Riesgo relativo (RR)	I.C. del 95% para RR	Umbral de decisión* (segundos)
Todos los acontecimientos	PFA CADP	3,65	1,76 – 7,57	<90
Fallecimiento	PFA CADP	6,56	1,93 – 22,35	<90
IM	PFA CADP	2,61	0,85 – 8,00	<96
ACV	PFA CADP	6,84	1,81 – 57,82	<90

*Nota: para IM y ACV, los valores de RR no fueron estadísticamente significativos.

Validación de HSPA como un factor de riesgo independiente: Se presentaron dos análisis multivariantes para la consideración con el fin de mostrar que HSPA no es simplemente el subproducto de cierta correlación espúrea, sino que es en sí mismo un factor de riesgo para experimentar acontecimientos adversos. Para este objetivo final, se empleó la regresión de Poisson para estimar los riesgos relativos que relacionan las diversas variables de desenlace frente a HSPA y otros factores de riesgo típicos. Sin embargo, la utilidad de estos modelos se ve obstaculizada cuando se usan demasiadas variables de pronóstico. Con el fin de limitar el número de variables que entraban en el modelo, se usó una regresión de Poisson para determinar qué factores de riesgo se asociaron con HSPA, y por tanto podrían generar una correlación espúrea entre HSPA y las variables de desenlace de interés. Este análisis halló que el recuento de plaquetas y el tabaquismo estaban asociados significativamente con HSPA al nivel de significación de 0,05 (tabla 3). Por tanto, sólo era necesario introducir estas variables en el modelo estadístico para demostrar la capacidad de HSPA para predecir acontecimientos, incluso después de corregir el efecto de variables concomitantes en el modelo (tabla 4). HSPA era un factor pronóstico significativo del acontecimiento compuesto y fallecimiento. Aunque todas las estimaciones de RR eran mayores que la unidad, HSPA generó resultados estadísticamente no significativos con los desenlaces IM y ACV.

Tabla 3. HSPA frente a factores de riesgo potenciales

Variable	Valor de p
Recuento de plaquetas	0,045
Tabaquismo	0,029
Edad	0,437
Hemoglobina	0,131
Diabetes	0,197
CABG anterior	0,334
ICP anterior	0,869
IM anterior	0,062
ACV anterior	0,617
ICC	0,149

Tabla 4. Riesgo relativo para HSPA después de la corrección para factores de riesgo concomitantes.

Desenlace	RR para HSPA (IC del 95%)	valor de p
dcmva*	2,47 (1,11 – 5,48)	0,026
Fallecimiento	4,89 (1,36 – 17,52)	0,015
IM	1,18 (0,41 – 3,38)	0,762
ACV	3,30 (0,36 – 30,69)	0,293

*Acontecimiento compuesto: fallecimiento, IM o ACV (dcmva).

Discusión

El estudio actual se centró en los resultados no evaluados previamente usando análisis ROC para evaluar HSPA y desenlaces clínicos específicamente en el subgrupo de pacientes sensibles a la aspirina. Por tanto, a pesar de la aspirina aparentemente terapéutica, los pacientes experimentaron un riesgo significativamente aumentado de acontecimientos adversos importantes posteriores si su CADP CT era <90 segundos. Esto siguió siendo cierto cuando se consideraron en conjunto todos los pacientes (sensibles a la aspirina y resistentes a la aspirina) en los que el RR para acontecimientos compuestos era de 2,88 (I.C. del 95%: 1,50-5,52) y para fallecimiento era de 5,32 (I.C. del 95%: 1,81 – 15,66) (datos no mostrados). Adicionalmente, los análisis multivariantes respaldan a HSPA

como un factor pronóstico independiente de mortalidad más que simplemente ser un representante de otros factores de riesgo.

5 El CADP CT se correlacionó con los acontecimientos compuestos de una manera que aparece por ser independiente de la presencia de aspirina. Esta observación concuerda con la insensibilidad general del cartucho de CADP para la inhibición plaquetaria inducida por aspirina y sugiere que CADP CT está detectando una hipersensibilidad plaquetaria dependiente de ADP subyacente que es clínicamente significativa.

10 El valor predictivo negativo (NPV) de CADP CT para los acontecimientos compuestos e individuales osciló entre el 94,7% y el 99,4%, respectivamente (tabla 5). De manera no sorprendente, los valores predictivos positivos (PPV) eran bajos (<20%), mientras que la sensibilidad y especificidad oscilaron entre el 73% y el 83% y entre el 50% y el 62%, respectivamente. Esto sugiere que la medición de HSPA tiene un alto valor predictivo de exclusión para acontecimientos clínicos adversos en pacientes coronarios.

Tabla 5. Rendimiento clínico de las pruebas de función plaquetaria para acontecimientos clínicos adversos importantes.

Desenlace	% de sensibilidad	% de especificidad	% de PPV	% de NPV
Todos los acontecimientos	72,7	61,6	19,2	94,7
Fallecimiento	82,4	60,9	11,4	98,3
IM	73,3	49,8	7,2	97,2
ACV	83,3	58,6	4,0	99,4

Resumen

A pesar de la importancia clínica de detectar la respuesta antiplaquetaria a la aspirina, parece existir hipersensibilidad a ADP subyacente en algunos pacientes con enfermedad cardiovascular estable que aumenta significativamente su riesgo de experimentar acontecimientos clínicos adversos importantes. La HSPA no parece verse afectada por la aspirina terapéutica y puede detectarse mediante procesos dependientes de ADP que pueden medirse mediante el sistema PFA-100® usando el cartucho de CADP. Este estudio se enfocó intencionadamente sólo en aquellos pacientes definidos como sensibles a la aspirina mediante criterios establecidos previamente de agregometría plaquetaria inducida por ácido araquidónico e inducida por ADP. El seguimiento promedió 22 meses para los acontecimientos clínicos adversos de fallecimiento, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. Los pacientes con CADP CT <90 segundos (125/296 = 42,2%) tuvieron una tasa de criterio de valoración compuesto del 19,2% (24/125), mientras que aquéllos con CADP CT ≥90 segundos (171/296 = 57,8%) tuvieron una tasa de criterio de valoración del 5,3% (9/171). Los pacientes con CADP CT <90 segundos tuvieron un riesgo relativo (RR) de 3,65 (I.C. del 95%: 1,76 – 7,57) para acontecimientos recurrentes y 6,56 (I.C. del 95%: 1,93 – 22,35) para fallecimiento en comparación con pacientes con CADP CT ≥90 s.

30 Las pruebas de función plaquetaria según los presentes métodos, usando el sistema PFA-100® como sistema a modo de ejemplo, parecen identificar un subgrupo de pacientes con enfermedad cardiovascular estable con un riesgo aumentado de experimentar acontecimientos adversos importantes que se asocia con hipersensibilidad a ADP, independientemente de una terapia con aspirina aparentemente eficaz.

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un paciente que tiene un riesgo aumentado de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso, en el que el paciente está sometiéndose a terapia antiplaquetaria con aspirina, comprendiendo dicho método:
 - 5 (a) evaluar una muestra que contiene plaquetas del paciente para determinar hiperactividad plaquetaria en el que el paciente es sensible a la aspirina, que se define como un paciente para el que se considera eficaz la terapia con aspirina, tal como se determina mediante un método de agregación óptica que utiliza agregometría plaquetaria inducida por ácido araquidónico e inducida por ADP y
 - 10 (b) relacionar la hiperactividad plaquetaria en la muestra con el riesgo del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la evaluación de la etapa (a) se lleva a cabo mediante la evaluación de la función de plaquetas en la muestra usando una prueba de función plaquetaria de alto cizallamiento.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que la función plaquetaria se evalúa mediante una prueba de función plaquetaria de alto cizallamiento usando un estimulador de la agregación plaquetaria, preferiblemente el estimulador de la agregación plaquetaria se selecciona del grupo que consiste en colágeno, ristocetina, ácido araquidónico, serotonina, adenosina-5'-difosfato, epinefrina y trombina y combinaciones de los mismos, más preferiblemente el estimulador de la agregación plaquetaria es
 - 20 colágeno y adenosina-5'-difosfato.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra se extrae a vacío a través de un capilar de manera que entra en contacto con una membrana que comprende una abertura y se activan las plaquetas en la muestra por medio de fuerza de cizallamiento y se mide el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario que bloquee la abertura y se relaciona con el riesgo aumentado de experimentar un
 - 25 acontecimiento cardiovascular adverso en el paciente.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la membrana comprende un estimulador de la agregación plaquetaria.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el estimulador de la agregación plaquetaria se selecciona del grupo que consiste en colágeno, ristocetina, ácido araquidónico, serotonina, adenosina-5'-difosfato, epinefrina y trombina y combinaciones de los mismos.
 - 30 7. Método según la reivindicación 5, en el que el estimulador de la agregación plaquetaria es colágeno y adenosina-5'-difosfato.
 8. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra que contiene plaquetas es sangre completa.
 9. Método según la reivindicación 1, para evaluar el riesgo de un acontecimiento cardiovascular adverso en un paciente que está sometiéndose a terapia antiplaquetaria con aspirina, comprendiendo dicho método:
 - 35 (a) extraer la muestra que contiene plaquetas de sangre completa a vacío a través de un capilar de modo que entra en contacto con una membrana que comprende una abertura y se activan las plaquetas en la muestra por medio de fuerza de cizallamiento, en el que la membrana comprende un estimulador de la agregación plaquetaria y en el que el paciente es sensible a la aspirina, que se define como un paciente para el que se considera eficaz la terapia con aspirina, tal como se determina mediante un método de agregación óptica utilizando agregometría plaquetaria inducida por ácido araquidónico e inducida por ADP,
 - 40 (b) medir el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario que bloquee la abertura de la membrana, y
 - 45 (c) relacionar el tiempo hasta la formación del trombo plaquetario con el riesgo del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso.
 10. Método según la reivindicación 9, en el que el estimulador de la agregación plaquetaria se selecciona del grupo que consiste en colágeno, ristocetina, ácido araquidónico, serotonina, adenosina-5'-difosfato, epinefrina y trombina y combinaciones de los mismos, preferiblemente el estimulador de la agregación plaquetaria es colágeno y adenosina-5'-difosfato.
 - 50 11. Método según la reivindicación 9, en el que la muestra que contiene plaquetas es sangre completa.
 12. Método según la reivindicación 9, en el que el tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario se

compara con un tiempo predeterminado y un tiempo hasta la formación de un trombo plaquetario menor que el tiempo predeterminado es indicativo de un riesgo aumentado del paciente de experimentar un acontecimiento cardiovascular adverso.

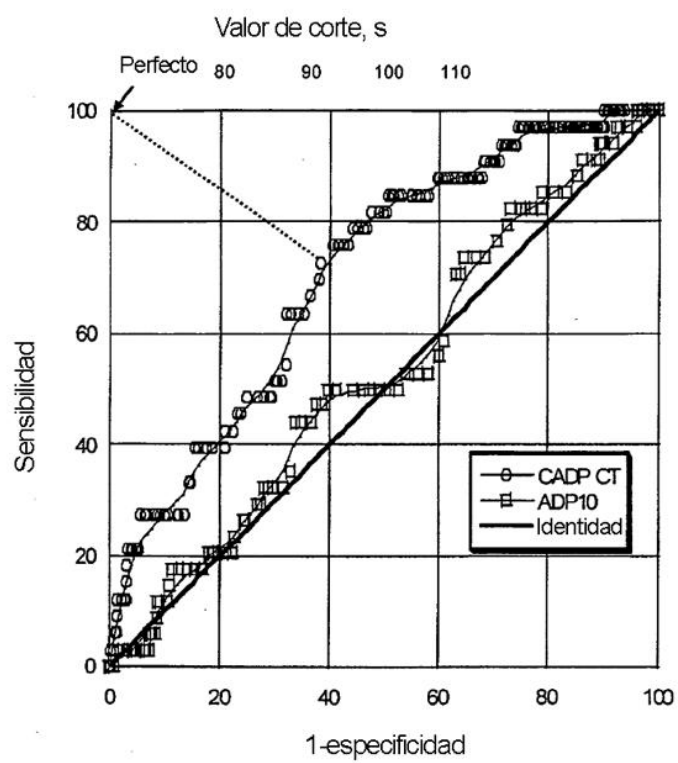


FIG. 1