

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 700**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08755007 .5**
- 96 Fecha de presentación: **02.05.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2153235**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **Métodos para medir la inhibición de la agregación de plaquetas mediante antagonistas del receptor de trombina**

30 Prioridad:  
**03.05.2007 US 915820 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.09.2012**

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

72 Inventor/es:  
**DURBIN, Dennis**

74 Agente/Representante:  
**Zea Checa, Bernabé**

ES 2 387 700 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

Métodos para medir la inhibición de la agregación de plaquetas mediante antagonistas del receptor de trombina

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención está relacionada con el campo de los ensayos de diagnóstico, y en particular con la determinación de la actividad de la función de plaquetas en muestras sanguíneas para estudiar los efectos de composiciones antiplaquetarias, y más particularmente el uso de un activador de plaquetas, tal como péptido activador del receptor de trombina (TRAP), para la medición de la función en plaquetas de los inhibidores del receptor de trombina, incluyendo E5555 (Eisai) y SCH 530348 (Schering-Plough), con sensibilidad aumentada.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] El papel de las plaquetas en la fisiología de mamíferos es extraordinariamente diverso, pero su papel primario es en la promoción de la hemostasis. En muchas situaciones, se desea una evaluación de la capacidad de la sangre para coagular, un parámetro que frecuentemente se controla por la capacidad de las plaquetas para adherirse y/o agregarse. Resulta de interés, por lo tanto, la evaluación de las funciones adhesivas de las plaquetas. Por ejemplo, las cuestiones de interés incluyen si administrar fármacos que bloqueen, o promuevan, la formación de coágulos, o si detectar deficiencias en la función de las plaquetas antes de procedimientos quirúrgicos. También resulta de interés evaluar la eficacia de un inhibidor de plaquetas que se ensaya como un nuevo fármaco o que se usa como tratamiento clínico aprobado en un paciente.

25 [0003] Se sabe que las plaquetas se agregan en una diversidad de condiciones y en presencia de varios reactivos diferentes. La agregación de plaquetas es un término usado para describir la unión de plaquetas entre sí. La agregación de plaquetas *in vitro* depende de la capacidad de las plaquetas para unir fibrinógeno a sus superficies después de activación por un agente inductor de agregación tal como trombina, adenosín difosfato (ADP) o colágeno.

30 [0004] Las plaquetas desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la hemostasis normal. Cuando se exponen a un vaso sanguíneo dañado, las plaquetas se adherirán a matriz sub-endotelial expuesta. Después de la adhesión inicial, diversos factores liberados o producidos en el sitio de la lesión tales como trombina, ADP y colágeno activan las plaquetas. Una vez que las plaquetas se activan, se produce un cambio conformacional en el receptor glucoproteína GPIIb/IIIa de plaquetas, permitiéndole unirse a fibrinógeno y/o factor de von Willebrand. Es esta unión del fibrinógeno multivalente y/o moléculas de factor de von Willebrand por receptores GPIIb/IIIa en plaquetas adyacentes lo que da como resultado el reclutamiento de plaquetas adicionales en el sitio de lesión y su agregación para formar un tapón hemostático o trombo.

40 [0005] La agregometría de plaquetas *in vitro* es el método de laboratorio usado para evaluar la capacidad *in vivo* de las plaquetas para formar los agregados que conducen a un tapón hemostático primario. En esta técnica, se añade un agente agregante tal como ADP o colágeno a sangre completa o plasma rico en plaquetas y se controla la agregación de las plaquetas. La agregometría de plaquetas es una herramienta de diagnóstico que puede ayudar en el diagnóstico de pacientes y selección de terapia. Los ensayos actuales para medir la agregación de plaquetas son caros, requieren mucho tiempo, son incómodos y generalmente no son adecuados para un ambiente clínico.

45 [0006] Se ha desarrollado un ensayo de la función de las plaquetas rápido y se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.763.199 (Coller). El ensayo determina bloqueo del receptor glucoproteína GPIIb/IIIa en sangre completa. La aglutinación de perlas poliméricas pequeñas recubiertas con un ligando de GPIIb/IIIa tal como fibrinógeno resulta cuando las perlas se ponen en contacto con sangre completa que contiene plaquetas con receptores GPIIb/IIIa activados que no están bloqueados. La no aglutinación indica que los receptores GPIIb/IIIa no se activan y/o bloqueo de los receptores GPIIb/IIIa. En una realización preferida, la adición de un activador de receptor de trombina da como resultado un ensayo que es suficientemente rápido y conveniente para realizarse a la cabecera y que da como resultado aglutinación de las perlas poliméricas pequeñas en un periodo de tiempo conocido conveniente si los receptores GPIIb/IIIa no están bloqueados. El ensayo incluye la capacidad para transferir sangre para ensayar de un recipiente de recogida a un dispositivo de ensayo sin abrir el recipiente de recogida. Este ensayo de agregación de plaquetas puede realizarse a la vez que el tiempo de coagulación activado (ACT), que se realiza para evaluar la adecuación de la heparinización.

60 [0007] La agregación de plaquetas desempeña un papel clave en la patogénesis de trombosis y enfermedad de arteria coronaria aguda. Un enfoque para tratar trombosis implica inhibir la actividad enzimática de trombina, y los compuestos usados para este fin han incluido heparina, heparina de bajo peso molecular, hirudina, argatroban, hirulog, etc. Todos los compuestos tales inhiben la actividad enzimática de trombina, y actúan inhibiendo la formación de coágulos sanguíneos de fibrina sin inhibir específicamente el efecto de la trombina en las células. La tendencia a la hemorragia es por lo tanto un efecto secundario habitual encontrado en la clínica.

65 [0008] El papel de la trombina en trombosis no se limita a su actividad de coagulación sanguínea. Además de su

papel central en la hemostasis y curación de heridas, la trombina activa las plaquetas humanas uniéndose a dos receptores activados por proteasa acoplados a proteínas G de superficie celular, PAR-1 y PAR-4, que también se conocen como los receptores de trombina. (Véase Kahn, *et al.*, Nature 1998, 394:690-694; Kahn, *et al.*, J. Clin. Invest. 1999, 103:879-887). La afinidad por la trombina es más alta para PAR-1 que PAR-4, y por lo tanto se cree que la activación de plaquetas por dosis bajas de trombina está predominantemente mediada por PAR-1. Se ha sugerido que PAR-4 mantiene la activación de plaquetas prolongada por altas dosis de trombina. (Véase Covic, *et al.*, Biochemistry 2000, 39:5458-5467; Covic, *et al.*, Thromb. Haemost. 2002, 87:722-727). La activación de los receptores PAR-1 y PAR-4 desencadena liberación de calcio intracelular, que activa PKC, modulando de este modo glucoproteína IIb/IIIa y permitiendo que los sitios de unión a ligando de integrina contribuyan a la agregación de plaquetas. La liberación de calcio intracelular inducida por trombina también activa fosfolipasa A2, liberando ácido araquidónico, la primera etapa en la biosíntesis de prostaglandina y tromboxano.

**[0009]** Se han clonado tanto PAR-1 como PAR-4. (Véase Vu, *et al.*, Cell 1991, 64:1057-1068; Xu, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95:6642-6646; Maryanoff, *et al.*, Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents 2003, 1(1):13-36), abriendo una puerta importante para el desarrollo de sustancias que se dirigen a receptores de trombina celular. El examen detallado de la secuencia de aminoácidos de estos receptores de trombina ha revelado que tanto PAR-1 como PAR-4 se escinden por trombina en sitios específicos en el dominio extracelular para desenmascarar una nueva secuencia N-terminal que se une al cuerpo del receptor e inicia la señalización transmembrana. (Véase Vu, *et al.*, Nature 1991, 353:674-677; Coughlin, S.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999, 96:11023-11027). Los péptidos específicos que reproducen la secuencia del nuevo extremo N-terminal de los receptores de trombina activados (habitualmente denominados "péptidos de activación del receptor de trombina" o "TRAP") son activadores potentes y selectivos de PAR-1 y PAR-4 no hidrolizados y se ha mostrado que desencadenan todas las respuestas de plaquetas inducidas por trombina. (Véase, Kahn, *et al.*, J. Clin. Invest. 1999, 103:879-887; Hung, *et al.*, J. Biol. Chem 1992, 267:20831-20834).

**[0010]** El péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1), que activa específicamente PAR-1, es un heptapéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: SFLLRNP (NH<sub>2</sub>-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-COOH). Por el contrario, el péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4), que activa específicamente PAR-4, es un hexapéptido: GYPGQV (NH<sub>2</sub>-Gly-Tyr-Pro-Gly-Gln-Val-COOH). Notablemente, se ha indicado que una variante más potente de TRAP-4, denominada como alternativa en la bibliografía TRAP-4 o TRAP-4A, tiene la secuencia de aminoácidos AYPGKF (NH<sub>2</sub>-Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-COOH). (Véase, por ejemplo, Soslau, *et al.*, J. Biol. Chem. 2001, 276 (24): 21173-21183).

**[0011]** La investigación sobre la relación de la actividad estructural de TRAP-1 sugiere que el pentapéptido TRAP-1 truncado Phe-Leu-Leu-Arg-Asn es un antagonista débil para receptores de trombina de plaquetas activados por trombina o TRAP-1. (Véase, Vassallo, *et al.*, J. Biol. Chem 1992, 267:6081-6085). Se han explorado diferentes enfoques para el antagonismo del receptor de trombina hasta la fecha. Uno de estos enfoques ha sido para preparar anticuerpos para el dominio de unión a trombina del receptor de trombina. Tales anticuerpos suprimen específicamente y eficazmente la activación de plaquetas por trombina, y actúan de este modo como antagonistas del receptor de trombina. (Véase, Hung, *et al.*, J. Clin. Invest. 1992, 89:1350-1353). Otro enfoque ha sido desarrollar derivados peptídicos de TRAP. (Véase Bernatowicz, *et al.*, J. Med Chem 1996, 39:4879-4887; Hoekstra, *et al.*, Bioorg. Med Chem Lett. 1998, 8:1649-1654; McComsey, *et al.*, Bioorg. Med Chem Lett. 1999, 9:255-260). Otro enfoque más ha sido buscar antagonistas del receptor de trombina de moléculas pequeñas usando diversos ensayos de exploración de alto rendimiento. (Véase Ahn, *et al.*, Bioorg. Med Chem Lett. 1999, 9:2073-2078). Se han descrito antagonistas del receptor de trombina tricíclicos sustituidos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.063.847, 6.326.380, 6.645.987, 6.894.065 y 7.037.920.

**[0012]** Puesto que la trombina es el activador más potente de las plaquetas humanas, un antagonista del receptor de trombina probablemente ejerce efecto antitrombótico potente en trombosis arterial rica en plaquetas. Como el antagonismo del receptor de trombina no inhibe la capacidad de trombina para generar fibrina, un agente tal probablemente provoque menos hemorragia que los anticoagulantes convencionales. Se espera que los compuestos que tienen acción antagonista en receptores de trombina muestren excelentes efectos para terapia o prevención de enfermedades asociadas con trombina, y por lo tanto ofrecen buenas perspectivas para terapia eficaz o prevención de, por ejemplo, trombosis, reestenosis vascular, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto cerebral, enfermedad cardíaca, coagulación intravascular diseminada, hipertensión, enfermedades inflamatorias, reumatismo, asma, glomerulonefritis, osteoporosis, trastornos neurológicos y tumores malignos.

**[0013]** E5555 (Eisai Co., Ltd., Véase Patentes de Estados Unidos N° 7.244.730 y 7.304.083), es un derivado de 2-iminopirrolidina que inhibe la agregación de plaquetas antagonizando el receptor de trombina activado por proteasa PAR-1. Se ha mostrado que E5555 tiene un efecto antitrombótico en un modelo de trombosis de cobaya y efectos inhibitorios en hiperplasia de neointima en un modelo de lesión de globo de rata y en respuesta contráctil inducida por trombina en un modelo de hemorragia subaracnoidea de conejo. (Véase Kogushi, *et al.*, J. Thromb. Haemost. 2007, 5 (Sup. 1):P-M-059; Kay, *et al.*, Stroke 2007, 38(12):3259-65). En células humanas, se ha mostrado que E5555 tiene efectos inhibidores en la liberación inducida por trombina o expresión de los marcadores inflamatorios, tales como IL-6, ligando CD40 y P-selectina, que se han ligado a acontecimientos de alto riesgo en pacientes con

síndrome coronario agudo (ACS). (Véase Kogushi, *et al.*). Se está sometiendo en la actualidad a ensayos clínicos en los Estados Unidos para enfermedad de arterias coronarias y síndrome coronario agudo.

5 **[0014]** SCH 530348 (Schering-Plough Corp., véase Patentes de Estados Unidos Nº 6.063.847, 6.326.380, 6.645.987, 6.894.065 y 7.037.920), un análogo tricíclico sustituido de himbacina (un compuesto natural derivado de la madera del magnolio australiano), es otro nuevo agente antiplaquetario de investigación que se ha mostrado que es un potente inhibidor del receptor de trombina PAR-1. Los estudios clínicos de fase II no han mostrado aumento del tiempo de hemorragia o prolongación de los tiempos de coagulación en pacientes tratados con SCH 530348. (Véase, por ejemplo, O'Donnell, *et al.*, "Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of noncarotid embolic Ischemic Stroke— A Critical Review", *Stroke*, publicado en línea antes que en impresión el 27 de marzo de 2008). Los análisis farmacocinéticos y farmacodinámicos relacionados mostraron que SCH 530348 demostraba inhibición inducida por agonista específica, dependiente de dosis, prolongada de la agregación de plaquetas en muestras de sangre de pacientes que experimentaban intervención coronaria percutánea no urgente (PCI). El compuesto se está sometiendo en la actualidad a ensayos clínicos de fase III para síndrome coronario agudo y para prevención de acontecimientos isquémicos aterotrombóticos.

10 **[0015]** Puesto que se espera que los antagonistas del receptor de trombina, tales como E5555 y SCH 530348, se usen en un gran número de pacientes con trastornos cardiovasculares y otros, sería beneficioso un método para detección de resistencia a un antagonista de receptor de trombina y evaluación de la eficacia del tratamiento con antagonista del receptor de trombina. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un ensayo que proporcione información acerca de la sensibilidad de antagonista del receptor de trombina y eficacia del tratamiento en un paciente dado.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

25 **[0016]** En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar métodos para ensayar una muestra de sangre que se ha visto afectada por un antagonista del receptor de trombina medida usando un activador del receptor de trombina, tal como trombina, péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1), o péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP- 4), como el activador de plaquetas.

30 **[0017]** Este y otros objetos de la presente invención se consiguen en un método para medir la inhibición de la agregación de plaquetas por un antagonista del receptor de trombina. En primer lugar, se obtiene una muestra de sangre que contiene plaquetas de un individuo tratado con un antagonista del receptor de trombina. A continuación, la muestra de sangre se pone en contacto con un activador del receptor de trombina en condiciones adecuadas para activar la agregación plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas. Finalmente, se evalúa la aglutinación mediada por plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas para determinar la presencia, ausencia y/o grado de inhibición de la agregación de plaquetas por el antagonista del receptor de trombina en el individuo. La ausencia o una reducción de la agregación de plaquetas indica que el individuo tiene capacidad reducida para formar trombos de plaquetas en respuesta al tratamiento con antagonista del receptor de trombina.

35 **[0018]** En otra realización de la presente invención, se proporciona un método alternativo para medir la inhibición de la agregación de plaquetas por un antagonista del receptor de trombina. En primer lugar, se obtiene una muestra de sangre que contiene plaquetas de un individuo tratado con un antagonista del receptor de trombina. A continuación, la muestra de sangre se pone en contacto con partículas que comprenden un ligando del receptor de GPIIa/IIIa inmovilizado en las mismas y un activador del receptor de trombina en condiciones adecuadas para activar la agregación de plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas. Finalmente, se evalúa la aglutinación mediada por plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas para determinar la presencia, ausencia y/o grado de inhibición de agregación de plaquetas por el antagonista del receptor de trombina en el individuo. La ausencia o una reducción de la agregación de plaquetas indica que el individuo tiene capacidad reducida para formar trombos de plaquetas en respuesta al tratamiento con antagonista del receptor de trombina.

40 **[0019]** También se describe un kit para medir la inhibición de la agregación de plaquetas por un antagonista del receptor de trombina que incluye un ligando del receptor GPIIb/IIIa inmovilizado en una partícula y un activador del receptor de trombina. En una realización preferida, también se proporcionan un anticoagulante y un tampón para mantener el pH y la concentración salina de la sangre anticoagulada dentro de un intervalo adecuado para la degradación de plaquetas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 **[0020]** La FIG. 1 ilustra la respuesta dependiente de dosis de muestras de sangre que contiene plaquetas de cuatro donantes diferentes a cuatro concentraciones diferentes de E5555.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 **[0021]** A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente

memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

5 **[0022]** No se pretende que la cita de publicaciones o documentos sea una admisión de que cualquiera de tales publicaciones o documentos sean técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión con respecto a los contenidos o fecha de estas publicaciones o documentos.

**[0023]** Como se usa en la presente memoria, “un” significa “al menos uno” o “uno o más”.

10 **[0024]** Como se usa en la presente memoria, el término “individuo” no se limita a una especie o tipo de muestra específica. Por ejemplo, el término “individuo” puede referirse a un paciente, y frecuentemente un paciente humano. Sin embargo, este término no se limita a seres humanos y por lo tanto abarca una diversidad de especies de mamífero.

15 **[0025]** Como se usa en la presente memoria, “tratamiento” significa cualquier manera por la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se alivian o se alteran de forma beneficiosa de otro modo. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente memoria.

20 **[0026]** Como se usa en la presente memoria, “enfermedad o trastorno” se refiere a una afección patológica en un organismo resultante de, por ejemplo, infección o defecto genético, y caracterizada por síntomas identificables.

25 **[0027]** Como se usa en la presente memoria, el término “trombina” se refiere a la serina proteasa que convierte fibrinógeno soluble en hebras insolubles de fibrina y cataliza varias otras reacciones relacionadas con coagulación. Este término no es específico de especie a no ser que se designe de otro modo. El término abarca  $\alpha$ -trombina, que es la forma nativa de la trombina, así como  $\gamma$ -trombina, un derivado no coagulante producido a partir de  $\alpha$ -trombina que conserva mucha de su capacidad activadora de plaquetas. Puesto que  $\gamma$ -trombina es enzimáticamente inactiva con respecto a fibrinógeno, su concentración habitualmente no se expresa en unidades/ml (U/ml), como sucede con  $\alpha$ -trombina. Sin embargo, se ha indicado en la bibliografía que 10-20 nm de  $\gamma$ -trombina es equivalente a 0,05-0,1 U/ml de  $\alpha$ -trombina. (Véase, por ejemplo, Soslau, *et al.*, J. Biol. Chem. 2001, 276 (24): 21173-21183).

30 **[0028]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “receptor de trombina” se refiere a cualquier miembro de la familia de receptores activados por proteasa (PAR) de receptores acoplados a proteína G que se active por trombina. Esta expresión no es específica de especie a no ser que se designe de otro modo. Hasta la fecha, se han caracterizado cuatro miembros de la familia PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4. (Véase MacFarlane, *et al.*, “Proteinase Activated Receptors”, Pharmacol. Rev. 2001, 53:245-282 para revisión). De estos cuatro receptores, PAR-1, PAR-3 y PAR-4 se activan por trombina, mientras que PAR-2 se activa por tripsina. Por lo tanto, la expresión “receptor de trombina” como se usa en la presente memoria se refiere en general a PAR-1, PAR-3 y PAR-4. Sin embargo, puesto que no se ha detectado expresión de PAR-3 en plaquetas humanas, solo PAR-1 y PAR-4 de los receptores activadores por proteasa conocidos en la actualidad son relevantes para la presente invención.

35 **[0029]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “activador del receptor de trombina” se refiere a cualquier molécula capaz de activar acontecimientos de señalización intracelular, incluyendo liberación de calcio intracelular, mediados por los receptores de trombina PAR-1 y/o PAR-4. Algunos activadores del receptor de trombina, tales como trombina, pueden activar PAR-1 y/o PAR-4 por escisión proteolítica; otros, tales como TRAP-1 y TRAP-4, pueden activar PAR-1 y PAR-4 no hidrolizados, respectivamente. Por lo tanto, debería entenderse que la expresión “activador del receptor de trombina” como se usa en la presente memoria no se limita a un modo particular de activación del receptor de trombina.

40 **[0030]** Como se usa en la presente memoria, el término “TRAP-1” se refiere al heptapéptido SFLLRNP (NH<sub>2</sub>-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-COOH), que activa específicamente PAR-1, y a peptidomiméticos y derivados funcionales de los mismos. El término “TRAP-4” como se usa en la presente memoria se refiere tanto al hexapéptido nativo GYPGQV (NH<sub>2</sub>-Gly-Tyr-Pro-Gly-Gln-Val-COOH) como al hexapéptido optimizado AYPGKF (NH<sub>2</sub>-Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-COOH, denominado en ocasiones TRAP-4A), ambos de los cuales activan específicamente PAR-4, y a peptidomiméticos y derivados funcionales de los mismos.

45 **[0031]** En diversas realizaciones de la presente invención, trombina, péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1) o péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4) se utiliza como un activador del receptor de trombina en la medición de inhibición de agregación de plaquetas por antagonistas del receptor de trombina, tales como E5555 y SCH 530348, en muestras de sangre. En consecuencia, las composiciones anteriormente mencionadas pueden emplearse, por ejemplo, para determinar la eficacia de terapia antiplaquetaria que implica tratamiento de pacientes con un derivado de 2-iminopirrolidina, tal como E5555, o un derivado de himbacina tricíclica sustituido, tal como SCH 530348. Las composiciones anteriores pueden emplearse junto con partículas recubiertas con un ligando del receptor GPIIb/IIIa y cualquier otro reactivo necesario para realizar un ensayo con respecto a la eficacia de los antagonistas del receptor de trombina. Puede usarse una composición del

reactivo liofilizada que comprenda la composición y partículas activadoras anteriormente mencionadas. En un enfoque, se mezcla mecánicamente un volumen medido de una muestra para medir tal como sangre completa con el reactivo liofilizado. Se controla un cambio en la transmisión de la luz y se calcula un índice de actividad de las plaquetas. En un aspecto, se combina una muestra de sangre completa en una cubeta o un cartucho separado en unidades con el reactivo liofilizado anteriormente mencionado. Puede emplearse un aparato para llevar a cabo el ensayo. El aparato comprende un pocillo para recibir la muestra conteniendo el pocillo reactivo liofilizado y otros reactivos para realizar el ensayo. Los reactivos adicionales pueden ser diversos tampones y/o estabilizadores de liofilización.

**[0032]** En una realización de la presente invención, se proporciona un método para medir la inhibición de la agregación de plaquetas por un antagonista del receptor de trombina. En primer lugar, se obtiene una muestra de sangre que contiene plaquetas de un individuo tratado con un antagonista del receptor de trombina. A continuación, la muestra de sangre se pone en contacto con un activador del receptor de trombina en condiciones adecuadas para activar la agregación de plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas. Finalmente, se evalúa la aglutinación mediada por plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas para determinar la presencia, ausencia y/o grado de inhibición de agregación de plaquetas por el antagonista del receptor de trombina en el individuo. La ausencia o una reducción de la agregación de plaquetas indica que el individuo tiene capacidad reducida para formar trombos de plaquetas en respuesta al tratamiento con antagonista del receptor de trombina.

**[0033]** En otra realización de la presente invención, se proporciona un método alternativo para medir la inhibición de la agregación de plaquetas por un antagonista del receptor de trombina. En primer lugar, se obtiene una muestra de sangre que contiene plaquetas de un individuo tratado con un antagonista del receptor de trombina. A continuación, la muestra de sangre se pone en contacto con partículas que comprenden un ligando del receptor de GPIIb/IIIa inmovilizado en las mismas y un activador del receptor de trombina en condiciones adecuadas para activar la agregación de plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas. Finalmente, se evalúa la aglutinación mediada por plaquetas en la muestra de sangre que contiene plaquetas para determinar la presencia, ausencia y/o grado de inhibición de la agregación de plaquetas por el antagonista del receptor de trombina en el individuo. La ausencia o una reducción de la agregación de plaquetas indica que el individuo tiene capacidad reducida para formar trombos de plaquetas en respuesta al tratamiento con antagonista del receptor de trombina.

**[0034]** En un aspecto, el receptor de trombina que se evalúa es PAR-1 o PAR-4. En consecuencia, en otro aspecto, el activador del receptor de trombina puede comprender una sustancia seleccionada del grupo que consiste en una trombina, un péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1) y un péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4). La concentración final de trombina típicamente varía de aproximadamente 0,01 unidades/ml (U/ml) a aproximadamente 0,5 U/ml, preferentemente de aproximadamente 0,05 U/ml a aproximadamente 0,1 U/ml. La concentración final de TRAP-1 habitualmente varía de aproximadamente 0,5  $\mu$ M a aproximadamente 10  $\mu$ M, preferentemente, de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 5  $\mu$ M. La concentración final de TRAP-4 habitualmente varía de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 1 mM, preferentemente, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,5 mM. Resulta importante que se sabe que la variante TRAP-4A (AYPGKF) es más potente que TRAP-4 de tipo silvestre (GYPGQV), de modo que pueden obtenerse niveles similares de agregación de plaquetas, por ejemplo, con TRAP-4 0,5 mM y TRAP-4A 0,1 mM.

**[0035]** En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para realizar un ensayo con respecto a la actividad de la función de plaquetas en una muestra de sangre completa. En otro aspecto, el ensayo de actividad de función de plaquetas puede realizarse en una muestra de plasma. En otro aspecto más, el ensayo de actividad de función de plaquetas puede llevarse a cabo en una muestra de plasma rica en plaquetas (PRP).

**[0036]** En una realización, la muestra es una que se ha visto afectada por un antagonista del receptor de trombina. Por ejemplo, la muestra puede ser de un paciente que se somete al tratamiento con un antagonista del receptor de trombina, tal como un antagonista de PAR-1 o PAR-4. En un aspecto, el antagonista del receptor de trombina comprende un anticuerpo para el dominio de unión a trombina de un receptor de trombina. En otro aspecto, el antagonista del receptor de trombina comprende un derivado peptídico o peptidomimético de un péptido TRAP, incluyendo TRAP-1 o TRAP-4. En otro aspecto más, el antagonista del receptor de trombina comprende un derivado de 2-iminopirrolidina, tal como E5555 (Eisai Co., Ltd., véase Patentes de Estados Unidos N° 7.244.730 y 7.304.083), o un derivado de himbacina tricíclica sustituida, tal como SCH 530348 (Schering-Plough Corp., véase Patentes de Estados Unidos N° 6.063.847, 6.326.380, 6.645.987, 6.894.065 y 7.037.920).

**[0037]** También se emplea en los presentes métodos un reactivo que comprende partículas recubiertas con un compuesto que puede dar como resultado la aglutinación específica de plaquetas, es decir, la aglutinación de plaquetas por interacción específica entre un receptor en las plaquetas y el compuesto en las partículas. Tales compuestos incluyen, como ilustración y no como limitación, anticuerpos para un receptor de plaquetas y ligandos del receptor GPIIb/IIIa, que puede ser una molécula orgánica pequeña, polipéptido, proteína, anticuerpo monoclonal o ácido nucleico que se une, forma complejo o interacciona con receptores GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas. Se da agregación mediada por plaquetas de las partículas cuando los receptores GPIIb/IIIa en la

superficie de las plaquetas se unen, forman complejo o interaccionan de otro modo con los ligandos del receptor GPIIb/IIIa en las partículas. Los ligandos de GPIIb/IIIa típicos incluyen fibrinógeno, anticuerpo monoclonal 10E5 (Coller, *et al.*, J. Clin. Invest. 1983, 72: 325), anticuerpo monoclonal c7E3 (The EPIC Investigators, N.E. J. Med. 1994, 330: 956), factor de von Willebrand, fibronectina, vitronectina y otros ligandos que tienen una secuencia de arginina glicina-ácido aspártico (RGD) u otros péptidos o peptidomiméticos que imitan esta secuencia (Cook, *et al.*, Drugs of the Future 1994, 19: 135). Otros compuestos de interés pueden incluir heparina de bajo peso molecular o similares.

**[0038]** Las partículas a las que se une el compuesto son de al menos 0,1 micrómetros y no más de aproximadamente 20 micrómetros. En una realización las partículas son de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. En otra realización las partículas son de al menos aproximadamente 1 micrómetro y menos de aproximadamente 8 micrómetros. Las partículas pueden ser prácticamente de cualquier forma, pero generalmente son esféricas con diámetros uniformes. La partícula puede tener cualquier densidad, pero preferentemente son de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,5 g/ml. Las partículas pueden tener o no una carga en la superficie, positiva o negativa, preferentemente negativa. Las partículas se funcionalizan o pueden funcionalizarse de modo que se unan de forma pasiva o adhieran tales miembros en su superficie, directa o indirectamente.

**[0039]** Las partículas pueden ser sólidas (por ejemplo comprendidas por polímeros orgánicos e inorgánicos o látex), gotas de aceite (por ejemplo, hidrocarburo, fluorocarburo, fluido de silicio), o vesículas (por ejemplo, sintéticas tales como fosfolípidos o naturales tales como células y orgánulos). Las partículas sólidas son normalmente polímeros, polímeros de adición o de condensación, que son fácilmente dispersables en un medio líquido. Los ejemplos de partículas que pueden suspenderse son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas, gotas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de partículas incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli (vinil cloruro), poli(acrilamida, poli(acrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(etilen tereftalato), nylon, poli(vinil butirato), polisacáridos tales como dextranos y dextranos modificados, etc.; usados por sí mismos o junto con otros materiales. Las partículas sólidas pueden estar comprendidas por poliestireno, poli(acrilamida, homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas, siliconas y similares.

**[0040]** Como se ha mencionado anteriormente, las partículas se recubren con el compuesto. Habitualmente, el compuesto se une de forma pasiva a las partículas. Dicha unión pasiva puede conseguirse por técnicas bien conocidas, habitualmente disponibles en la bibliografía. (Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press. Nueva York (1978); Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 1970, 245: 3059). Brevemente, como se ha mencionado anteriormente, la superficie de la partícula puede ser polifuncional o ser capaz de polifuncionalizarse. Está disponible o puede incorporarse una amplia diversidad de grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos de etileno, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. La forma de unir una amplia diversidad de compuestos a las superficies se conoce bien y se ilustra ampliamente en la bibliografía (véase anteriormente). La unión del miembro lateral puede ser directamente mediante un enlace o indirectamente a través de la intermediación de un grupo de unión. La longitud de un grupo de unión puede variar ampliamente, dependiendo de la naturaleza del miembro lateral y de la partícula.

**[0041]** La relación de moléculas de compuesto y partículas se controla en la unión de las moléculas de compuesto con la partícula. En un enfoque el número de sitios funcionalizados en la superficie de la partícula puede controlarse ajustando el número de tales sitios introducidos en la superficie de la partícula. Como alternativa, o junto con lo anterior, la relación de moléculas de compuesto y partícula puede controlarse ajustando la concentración del compuesto en el medio de reacción para la unión. Se sugerirán otros enfoques para un experto en la materia a la vista de la enseñanza anterior.

**[0042]** El reactivo de partículas empleado en la presente invención puede tratarse con una cantidad suficiente de material para bloquear las áreas de adsorción en las partículas. Tales materiales no afectarán al funcionamiento de las partículas para su fin pretendido en la presente invención. Los materiales de bloqueo incluyen proteínas tales como albúmina de suero bovino, gamma globulina bovina, etc., polisacáridos tales como dextrano, etc. y similares. En otro enfoque, que puede utilizarse junto con lo anterior, se emplean partículas en las que el número de sitios funcionalizados para unión reduce sustancialmente el área de adsorción en la superficie de las partículas.

**[0043]** Las partículas habitualmente comprenden un marcador, unido a las mismas o incorporado en las mismas. El marcador puede ser cualquier resto que pueda usarse para el fin de detección. El marcador es con frecuencia un miembro de un sistema productor de señales. El marcador puede detectarse directa o indirectamente. El marcador puede ser isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un colorante, molécula fluorescente, molécula quimioluminiscente, un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, coenzima, sustrato de enzima, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia polinucleotídica amplificable y así sucesivamente.

**[0044]** En una realización específica de la presente invención, las partículas contienen uno o más colorantes que

absorben en el infrarrojo. Tales colorantes incluyen bacterioclorina, bacterioclorofitina, colorantes de meropolimetina, benzoanulenos, porfirinas vinílogas, colorantes de polimetino, cianinas y merocianinas, y similares. Son colorantes específicos de interés cobre (II)-tetra-terc-butil-tetraquis(dimetilamino)-29H-31H-ftalocianina de y vanadil-tetra-terc-butil-tetraquis(dimetilamino)-29H-31H-ftalocianina. El colorante particular que se selecciona es uno con conveniencia, disponibilidad, estabilidad, compatibilidad con la partícula y similares. Estos colorantes pueden incorporarse directamente en la partícula en sí misma, a través de polimerización o adsorción pasiva. Los colorantes pueden cargarse individualmente (es decir, secuencialmente) o en combinación (es decir, simultáneamente). Como alternativa, los colorantes pueden unirse a la perla en combinación con el componente de unión, de modo que no lixivien desde la superficie. Independientemente del método de carga usado, las condiciones son tales que la superficie de partícula no se ve afectada con respecto a la capacidad para aglutinar en condiciones apropiadas.

**[0045]** Los colorantes absorben luz en el intervalo infrarrojo de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 900 nm, particularmente en el intervalo de aproximadamente 750-850 nm. Para muestras con altos niveles de glóbulos rojos, la luz está a aproximadamente  $800 \pm 10$  nm, que es el punto isosbético para oxihemoglobina y hemoglobina reducida. La cantidad de colorante empleado con las partículas varía con el coeficiente de extinción del colorante en el intervalo de luz de interés, la sensibilidad requerida del ensayo, el tamaño de las partículas, el modo de unión del colorante con las partículas, compatibilidad del colorante con la matriz de partículas y similares. Habitualmente, la cantidad de colorante incorporado está en el intervalo de aproximadamente 1 a 20% en peso, más habitualmente de 5 a 15% en peso. Son colorantes que encuentran un uso particular en la presente invención las ftalocianinas. Las ftalocianinas sin metales absorben aproximadamente 700 nm ( $\epsilon=162.000$ ). Los complejos metálicos desplazan la absorción a longitud de onda más corta o más larga, la mayoría de los metales desplazan la absorción a una longitud de onda mucho más corta, pero algunos, tales como plomo, absorben a longitud de onda mucho más larga que las ftalocianinas sin metales.

**[0046]** Los complejos formados entre metales de transición y ftalocianinas (metaloftalocianinas y metalonaftaloftalocianinas) son químicamente muy estables a la luz y al calor. Se forman por condensación de optalodinitrilos en presencia de un metal apropiado. Algunos de los metales usados en la formación de las metaloftalocianinas además de cobre (Cu) y vanadio (V) son magnesio (Mg), cinc (Zn) y cobalto (Co).

**[0047]** En una realización específica de la invención se emplean micropartículas carboxiladas con un máximo de absorción plano. Estas micropartículas se preparan incorporando múltiples colorantes que tienen máximo de absorción definido cercano a 805 nm. Esto da como resultado un espectro de absorción máxima plano a través de un amplio intervalo de longitud de onda de 780-820 nm.

**[0048]** La muestra puede ser cualquier solución, sintética o natural para analizar cuando la muestra se ha sometido a un efecto de un antagonista del receptor de trombina, particularmente, E5555 o SCH 530348. El término muestra incluye tejido biológico, incluyendo fluidos corporales, de un hospedador, y así sucesivamente. La muestra puede examinarse directamente o puede pretratarse, habitualmente. La presente invención tiene aplicación particular a muestras que comprenden plaquetas incluyendo fluidos corporales tales como, por ejemplo sangre completa, fracciones de sangre que contiene plaquetas tales como plasma y similares. En una realización la invención tiene aplicación particular a muestras de sangre completa. La cantidad de la muestra depende de la naturaleza de la muestra. Para muestras fluidas tales como sangre anticoagulada completa, la cantidad de la muestra es habitualmente de aproximadamente 30  $\mu$ l a 5 ml, preferentemente, de aproximadamente 100 a 300  $\mu$ l. El término "muestra" incluye muestras no procesadas directamente de un paciente o muestras que se han pretratado y preparado en cualquier medio líquido conveniente, habitualmente un medio acuoso (por ejemplo, citrato sódico).

**[0049]** Preferentemente, el medio para realizar los ensayos de acuerdo con la presente invención es un medio acuoso. También pueden emplearse otros co-disolventes polares en el medio, habitualmente disolventes orgánicos oxigenados de 1-6, más habitualmente de 1-4 átomos de carbono, incluyendo alcoholes, éteres y similares. Habitualmente, tales co-disolventes se presentan en menos de aproximadamente 70% en peso, más habitualmente, en menos de aproximadamente 30% en peso. Adicionalmente, se emplean frecuentemente diversos materiales complementarios en el método de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, normalmente están presentes tampones en el medio de ensayo, así como estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes de ensayo; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, polialquilen glicoles; o similares.

**[0050]** El pH para el medio está habitualmente en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 11, preferentemente, de aproximadamente 4 a aproximadamente 9. Pueden usarse diversos tampones para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante el método. Los tampones ilustrativos incluyen HEPES, borato, fosfato, carbonato, Tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para el método pero puede preferirse un tampón frente a otros en ciertas circunstancias. En algunas circunstancias, se prefiere HEPES y está presente a una concentración de aproximadamente 0,001 M a aproximadamente 0,05 M, típicamente a una concentración de aproximadamente 0,01 M.

**[0051]** El volumen de medio de ensayo es de aproximadamente 25  $\mu$ l a aproximadamente 500  $\mu$ l, habitualmente



de aproximadamente 75  $\mu$ l a aproximadamente 250  $\mu$ l. Los ensayos pueden llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado. De manera práctica, el recipiente es una cubeta o cartucho que se usa con el instrumento para llevar a cabo el ensayo y medir los resultados de ensayo. El recipiente de reacción habitualmente contiene el iniciador de activación de acuerdo con la presente invención en forma liofilizada seca junto con otros reactivos tales como el reactivo de partículas y similares, estabilizadores y así sucesivamente.

**[0052]** La combinación de muestra y reactivo de partículas se incuba en condiciones para aglutinar las partículas. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método. La temperatura puede ser constante o puede variar. Habitualmente, se emplea una temperatura constante durante la etapa de reacción. la temperatura empleada es habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 °C, más habitualmente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 °C, preferentemente, la temperatura debería ser de al menos 25 °C, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 °C, habitualmente aproximadamente 37 °C.

**[0053]** Se determina el alcance de la aglutinación de las partículas y se relaciona con la presencia y/o cantidad del antagonista del receptor de trombina en la muestra. La presencia de aglutinación puede determinarse visualmente observando el agrupamiento de las partículas, que indicaría aglutinación. Preferentemente, como se ha mencionado anteriormente, las partículas pueden colorearse para ayudar en la visualización de la aglutinación o agrupamiento de la matriz. El alcance de la aglutinación puede medirse de forma espectrofotométrica, turbidimétrica, nefelométrica, etc., observando la tasa de cambio de la densidad óptica del medio y así sucesivamente.

**[0054]** En una realización específica de la presente invención se realiza un ensayo con respecto a la actividad de la función de plaquetas en una muestra de sangre completa de un paciente que se somete a tratamiento con E5555 o SCH 530348. La muestra se combina en un recipiente adecuado, por ejemplo, cubeta de reacción, con partículas recubiertas con fibrinógeno, y un activador del receptor de trombina, tal como trombina, péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1) o péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4), para formar un medio de ensayo. Las partículas del reactivo de partículas tiene uno o más colorantes infrarrojos incorporados en el mismo. La combinación se somete a condiciones de aglutinación. Después, el medio se irradia con luz en la región infrarroja. Se determina la transmisión de luz infrarroja desde la mezcla de ensayo en la que el nivel de transición se relaciona con la actividad de la función de las plaquetas.

**[0055]** Se selecciona el medio de aglutinación para tener una absorción máxima a aproximadamente 800 nm. La relación entre el coeficiente de absorción del medio de aglutinación y el coeficiente de absorción de sangre completa debería ser preferentemente mayor de 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.

**[0056]** Después de que la muestra se haya combinado con los reactivos, idealmente se calentará a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, pero debajo de la que interferiría con el ensayo, para asegurar que la temperatura puede controlarse sin afectar de forma adversa al resultado del ensayo. De forma ideal, la temperatura debería ser de al menos 25 °C, preferentemente en el intervalo de 30-40 °C, más preferente a aproximadamente 37 °C. El medio de reacción habitualmente se agita suavemente tras combinar los reactivos con la muestra y durante el periodo de la reacción. La agitación es suficiente para conseguir y mantener homogeneidad en las muestras de ensayo. El tiempo total de las lecturas desde el tiempo 0 (tiempo de mezcla), puede variar de aproximadamente 10 segundos a 10 minutos, más habitualmente de aproximadamente 30 segundos a 8 minutos, y preferentemente de aproximadamente 30 segundos a 3 minutos. Los datos pueden analizarse por cualquier medio conveniente, particularmente usando un algoritmo que puede manipular los datos en relación con calibradores y/o controles.

**[0057]** El nivel de aglutinación es un indicio de la actividad de la función de las plaquetas de la muestra ensayada. El nivel de aglutinación puede compararse frente a un patrón de actividad de función de las plaquetas conocido. Habitualmente, el resultado se comparará con un calibrador, lo que puede realizarse de forma conjunta o se ha realizado previamente o puede proporcionarse como una curva patrón.

**[0058]** El método de la presente invención puede emplearse junto con un ensayo para conteo de plaquetas tal como el descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 09/177.884 presentada el 23 de octubre de 1998 y Solicitud Internacional N° PCT/US1999/24670 presentada el 20 de octubre de 1999 (N° de Publicación WO/2000/025140).

**[0059]** Los ensayos anteriores pueden realizarse preferentemente en un dispositivo, que permite que se produzcan las reacciones de acuerdo con la presente invención y que mide los resultados de las mismas. El instrumento debería evaluar la función de las plaquetas basándose en la capacidad de las plaquetas activadas de unirse a fibrinógeno. A medida que las plaquetas activadas se unen y aglutinan partículas recubiertas con fibrinógeno, hay un aumento de la transmisión de la luz. En general, un instrumento para medir el resultado del ensayo es uno que puede medir la aglutinación. Preferentemente, el instrumento mide un cambio de la señal óptica

debido a aglutinación. Los instrumentos adecuados se incluyen, como ilustración y no como limitación, un espectrofotómetro cinético, instrumento de Sistema VERIFYNOW™ (disponible en el mercado de Accumetrics, Inc., San Diego, Calif. y empleado para mediciones de la actividad de función de plaquetas rápidas en muestras normales) o similares.

5  
10  
15  
20  
[0060] El instrumento del Sistema VERIFYNOW™ es un sistema de detección óptico basado en turbidometría que mide la agregación inducida por plaquetas como un aumento de la transmisión de la luz. El sistema incluye un analizador, cartucho desechable y controles. El cartucho contiene reactivos basados en tecnología de aglutinación de micropartículas. El sistema de control de calidad incluye un control electrónico, dos niveles de controles “húmedos” ensayados (WQC), un sensor de humedad dentro del cartucho, un indicador de temperatura dentro del envase, y un ensayo para la concurrencia de dos canales de ensayo. El analizador controla la secuenciación del ensayo, establece la temperatura de ensayo, controla la mezcla de muestra-reactivo durante la duración requerida, determina el grado de función de las plaquetas, presenta el resultado y realiza auto-diagnóstico. Para su uso en los presentes métodos el cartucho de ensayo del sistema contiene una preparación liofilizada que comprende partículas con ligando de receptor GPIIb/IIIa unido de forma pasiva, un activador del receptor de trombina y tampón. La muestra del paciente habitualmente es sangre completa con citrato, que se dispersa automáticamente desde el tubo de recogida de sangre al cartucho por el analizador, sin requerirse manipulación de la sangre por el usuario. La interacción se controla por las características de absorbancia infrarroja de las partículas. A medida que las partículas interactúan con las plaquetas, la aglutinación de las partículas se mide a través del sistema óptico del instrumento VERIFYNOW™. La aglutinación se detecta como un aumento de la transmisión de luz infrarroja a través de la muestra.

25  
30  
[0061] En otra realización de la presente invención hay un kit que incluye en combinación envasada una preparación liofilizada que comprende partículas con fibrinógeno unido de forma pasiva, un activador del receptor de trombina, tal como trombina, péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1), o péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4) y tampón. La preparación liofilizada puede estar presente en un recipiente de reacción tal como un cartucho usado en el instrumento de análisis. Para el Sistema VERIFYNOW™ anteriormente mencionado, la preparación liofilizada puede situarse en los pocillos exteriores del cartucho de 4 pocillos usado en el analizador. El kit también puede incluir un recipiente de recogida de muestras y/o un dispositivo para llevar a cabo el presente método. Las cantidades relativas de reactivos pueden variarse ampliamente para posibilitar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad de una determinación.

35  
40  
[0062] Cuando sea apropiado, los reactivos pueden colocarse en un envase hermético para mantener la actividad de cualquier reactivo. El envase puede ser, por ejemplo, una bolsa, bolsillo, o similares fabricado a partir de un material que sea sustancialmente no permeable a la humedad. Tales materiales incluyen, por ejemplo y sin limitación, plástico, papel de aluminio y similares. Para muestras de sangre el kit también puede incluir un artículo para perforar la piel de una persona, almohadillas desinfectantes o esterilizantes y así sucesivamente. El kit también puede incluir calibradores y patrones. Además, el kit también puede incluir uno o más reactivos para realizar un ensayo para conteo de plaquetas.

45  
50  
[0063] El kit puede incluir los reactivos necesarios para llevar a cabo 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 evaluada dentro de intervalos adecuados para aglutinación mediada por plaquetas de la superficie sólida y perlas poliméricas pequeñas recubiertas con ligando de receptor GPIIb/IIIa de plaquetas. El tampón puede estar en solución, o puede consistir solamente en la composición tamponante y sales a las que se añade una cantidad conocida de agua para proporcionar la solución de tampón deseada. Opcionalmente, el kit también puede comprender un anticoagulante. En una realización, el tampón es HEPES; el anticoagulante es citrato; un ligando de receptor GPIIb/IIIa es fibrinógeno; las perlas poliméricas pequeñas son poliacrilonitrilo o poliestireno carboxilado en el que un ligando del receptor GPIIb/IIIa peptídico, tal como fibrinógeno, se une de forma pasiva con la superficie de la perla por medio de una interacción de enlace de hidrógeno y/o hidrófobo entre el péptido y el grupo funcional en la superficie de la perla. En una realización más, el kit comprende adicionalmente un activador del receptor de trombina, tal como trombina, péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1) o péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4).

55  
[0064] Se pretenden que el siguiente ejemplo y preparaciones ilustren la invención pero no se pretende que limiten su alcance. Las partes y porcentajes son en peso a no ser que se indique de otro modo.

#### Ejemplo

60  
[0065] Se realizó un experimento para determinar la inhibición de plaquetas dependiente de dosis por el antagonista de PAR-1 E5555 (Eisai Co., Ltd.) usando el Ensayo VERIFYNOW™ IIb/IIIa (Accumetrics, Inc. San Diego, Calif.) y péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1) como el activador de plaquetas.

65  
[0066] Se realizó ensayo de respuesta a dosis con TRAP-1 a 3,7 μM. Se usó E5555 a concentraciones finales de 30 ng/ml, 10 ng/ml, 5,0 ng/ml y 1,0 ng/ml. Se realizaron adiciones de 20 μl de cada solución madre a 2,0 ml de

sangre completa (dilución 1:100) y se mezclaron cuidadosamente para evitar la hemólisis. Después de mezclar, las muestras de sangre se incubaron durante 30 minutos a 37 °C antes del ensayo de inhibición de plaquetas.

5 **[0067]** Se procesaron muestras de sangre de cuatro donantes humanos por duplicado en la línea basal y para cada una de las cuatro concentraciones de E5555. Como cabría esperar, hubo variabilidad de donante a donante en los niveles de inhibición de plaquetas medida a una concentración dada de E5555. Basándose en los niveles esperados de inhibición a cada concentración de E5555 proporcionada, los resultados reales fueron de media ligeramente más bajos de lo esperado en los cuatro donantes. Las tasas de inhibición de plaquetas para cada donante en relación con sus valores de línea basal correspondiente se resumen en la Figura 1 y Tabla 1 posterior.

10

**Tabla 1.** Inhibición de plaquetas dependiente de dosis por E5555 en muestras de sangre de donantes humanos

% de Inhibición	E5555 30 ng/ml	E5555 10 ng/ml	E5555 5 ng/ml	E5555 1 ng/ml
Donante ID: 60	82%	46%	17%	7%
Donante ID: 75	78%	39%	15%	-1%
Donante ID: 137	88%	66%	35%	7%
Donante ID: 126	97%	77%	51%	5%
<b>Media</b>	<b>86%</b>	<b>57%</b>	<b>30%</b>	<b>5%</b>
Esperada	100%	70-100%	40-80%	10-50%

15 **[0068]** Como se ilustra en la Figura 1 y en la Tabla 1, los anteriores reactivos y sistema detectaron de forma exitosa el alcance de la agregación de plaquetas a partir de una muestra de sangre tratada con diferentes dosis de un antagonista del receptor de trombina (PAR-1). Por lo tanto, resulta evidente a partir de los resultados anteriores que se proporciona un método sencillo, rápido por la presente invención para medir la agregación de plaquetas en muestras de sangre que se han visto afectadas por exposición a un antagonista del receptor de trombina.

20 **[0069]** El ejemplo anterior se incluye para fines ilustrativos solamente y no se pretende que limite el alcance de la invención. Son posibles muchas variaciones del ejemplo descrito anteriormente. Puesto que resultaran evidentes para los expertos en la materia modificaciones y variaciones del ejemplo descrito anteriormente, se pretende que la presente invención se limite solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para medir la inhibición de la agregación de plaquetas por un antagonista del receptor de trombina, que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar una muestra de sangre que contiene plaquetas de un individuo tratado con un antagonista del receptor de trombina;
- b) poner en contacto dicha muestra de sangre que contiene plaquetas con un activador del receptor de trombina en condiciones adecuadas para activar la agregación de plaquetas en dicha muestra de sangre que
- 10 contiene plaquetas; y
- c) evaluar la agregación de plaquetas en dicha muestra de sangre que contiene plaquetas para determinar la presencia, ausencia y/o grado de inhibición de la agregación de plaquetas por dicho antagonista del receptor de trombina en dicho individuo, en donde la ausencia o una reducción de dicha agregación de plaquetas indica
- 15 que dicho individuo tiene capacidad reducida para formar agregación de plaquetas en respuesta a dicho tratamiento con antagonista del receptor de trombina en el que,

el antagonista del receptor de trombina comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo para el dominio de unión a trombina de un receptor de trombina, un derivado peptídico de TRAP-1, un derivado peptídico de TRAP-4, un péptido mimético de un derivado de TRAP-1, un peptidomimético de un derivado de TRAP-4, E5555 y SCH 530348.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor de trombina es PAR-1 o PAR-4.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el activador del receptor de trombina comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en una trombina, un péptido activador del receptor de trombina PAR-1 (TRAP-1) y un péptido activador del receptor de trombina PAR-4 (TRAP-4).

4. El método de la reivindicación 3, en el que la trombina tiene una concentración final de 0,01 U/ml a 0,5 U/ml.

5. El método de la reivindicación 3, en el que el TRAP-1 tiene una concentración final de 0,5 μM a 10 μM.

6. El método de la reivindicación 3, en el que el TRAP-4 tiene una concentración final de 50 μM a 1 mM.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el activador del receptor de trombina comprende TRAP-1.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre que contiene plaquetas es una muestra de sangre completa.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre que contiene plaquetas es una muestra de plasma.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la muestra de plasma es una muestra de plasma rica en plaquetas (PRP).

11. El método de la reivindicación 1, en el que el antagonista del receptor de trombina comprende E5555.

12. El método de la reivindicación 1, en el que el antagonista del receptor de trombina comprende SCH 530348.

13. El método de la reivindicación 1, en el que el activador del receptor de trombina está contenido en un medio de ensayo que tiene una absorción máxima a aproximadamente 800 nm.

14. El método de la reivindicación 1, que se realiza a una temperatura que varía de 30 °C a 40 °C, y el tiempo total de las lecturas desde el tiempo de contacto entre la muestra de sangre que contiene plaquetas y el activador del receptor de trombina oscila en el rango de 10 segundos a 10 minutos.

15. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de sangre que contiene plaquetas se pone en contacto con dicho activador del receptor de trombina en un dispositivo de ensayo de uso único.

16. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente poner en contacto dicha muestra de sangre que contiene plaquetas con partículas que comprenden un ligando de receptor GPIIb/IIIa inmovilizado en las mismas.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el ligando del receptor GPIIb/IIIa comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, anticuerpo monoclonal 10E5, anticuerpo monoclonal c7E3, factor de von Willebrand, fibronectina, vitronectina, un ligando que tiene una secuencia de arginina glicina-ácido aspártico (RGD) y un péptido o un peptidomimético que imita la secuencia de RGD.

18. El método de la reivindicación 16, en el que el ligando del receptor GPIIb/IIIa comprende fibrinógeno.

19. El método de la reivindicación 16, en el que las partículas y el activador del receptor de trombina están contenidos en un medio de ensayo que tiene una absorción máxima a aproximadamente 800 nm.

FIGURA 1

