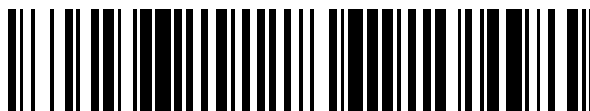


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 668**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007** **E 07007503 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013** **EP 1850134**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la determinación de la función plaquetaria y de las condiciones de flujo**

30 Prioridad:

28.04.2006 DE 102006020385

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2013

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
GÖRZHÄUSER HOF EMIL-VON-BEHRING-
STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

RECHNER, ANDREAS, DR.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 400 668 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

Procedimiento y dispositivo para la determinación de la función plaquetaria y de las condiciones de flujo.

La presente invención se enmarca en el ámbito del diagnóstico de la función plaquetaria y hace referencia a un procedimiento in vitro para la determinación de la función plaquetaria en condiciones de flujo, así como también a un dispositivo para la realización del mencionado procedimiento. El procedimiento es particularmente adecuado para la determinación del efecto del clopidogrel después de la ingestión oral y de otros antagonistas antiplaquetarios P2Y₁₂ más efectivos. Además, mediante el presente procedimiento puede comprobarse el bloqueo por antagonistas específicos del segundo receptor de ADP "adenosín difosfato" de los trombocitos (receptor P2Y₁).

Los procesos fisiológicos que garantizan, por un lado, la fluidez de la sangre en el sistema vascular y por otro lado, mediante la formación de coágulos, aseguran la prevención de pérdidas de sangre extravasculares, se engloban en el concepto de hemostasis. En la regulación de la hemostasis participan una pluralidad de factores proteicos, así como también componentes celulares, como los trombocitos (plaquetas). En el caso de una lesión vascular primero se presenta la incorporación de los trombocitos en el colágeno subendotelial. Este factor de adhesión se manifiesta mediante proteínas de adhesión como las del factor de von Willebrand (VWF). Durante el proceso de adhesión los trombocitos se activan y desde sus gránulos vierten sustancias mediadoras que inducen a la agregación de otros trombocitos, así como a un reforzamiento de la propia activación plaquetaria. De esta manera, se genera una obstrucción primaria de las paredes vasculares (hemostasis primaria), obstrucción que se estabiliza a través de otras reacciones del sistema coagulante plasmático (hemostasis secundaria). Una regulación errónea de estos procesos pueden conducir a una propensión a la trombosis o a la hemorragia y según sea el grado de gravedad, pueden tener consecuencias fatales.

En el diagnóstico de la coagulación se realizan varias pruebas in vitro, las cuales colaboran en la determinación cualitativa de la coagulación de la sangre de un paciente o en la determinación de la existencia de alguna disfunción en la coagulación. En el caso de una disfunción en la coagulación a menudo es necesario obtener una información más precisa de la propia causa de la disfunción que se esté presentando, para así poder elegir las medidas terapéuticas más oportunas. Una fase importante de la función plaquetaria del sistema de coagulación que puede ser examinada puntualmente es la hemostasis primaria, la cual depende esencialmente de la capacidad funcional de los trombocitos.

Los procesos empleados para la determinación de la función plaquetaria no se utilizan solamente para el diagnóstico de alteraciones de la función de los trombocitos adquiridas o heredadas, sino también para el control de terapias antiplaquetarias. Los medicamentos que inhiben la agregación plaquetaria se emplean principalmente para la profilaxis y terapia en sucesos tromboembólicos arteriales, como infarto de miocardio o apoplejía. Los principios activos más difundidos con efecto inhibidor de la agregación plaquetaria son el ácido acetilsalicílico (ASS) y las tienopiridinas, clopidogrel y ticlopidina. El ASS inhibe de forma irreversible la Ciclooxygenasa 1 (COX-1), una enzima intracelular que participa de la síntesis del tromboxano A₂, un estimulador de la agregación plaquetaria. El clopidogrel y la ticlopidina pertenecen, por su mecanismo de acción, a la clase de los antagonistas P2Y₁₂. Tras la ingestión oral de clopidogrel o ticlopidina se forman metabolitos en el hígado que bloquean de forma selectiva el receptor P2Y₁₂. El receptor purinérgico P2Y₁₂ es expresado en la superficie de los trombocitos y se activa mediante el adenosín difosfato (ADP) extracelular. Como consecuencia de la activación del receptor P2Y₁₂ se ponen en marcha procesos intracelulares en los trombocitos, como por ejemplo, la inhibición de la formación de (AMPc) o adenosín monofosfato cíclico que provocan una reacción de agregación plaquetaria. Los antagonistas P2Y₁₂ bloquean los receptores P2Y₁₂ sobre la superficie de los trombocitos y por tanto, tienen un efecto antiplaquetario.

El segundo receptor ADP purinérgico P2Y₁ también se expresa en la superficie de los trombocitos y se activa mediante el adenosín difosfato extracelular. Como consecuencia de la activación del receptor P2Y₁ se ponen en marcha procesos intracelulares en los trombocitos, (como por ejemplo, un incremento en el calcio intracelular), que activan una reacción de agregación plaquetaria. Los antagonistas del receptor P2Y₁ contrarrestan por tanto este proceso y tienen un efecto antiplaquetario.

Se considera cada vez más importante el conocimiento preciso del estado de la función plaquetaria de los pacientes que reciben una terapia antiplaquetaria dado que, por ejemplo, la aparición de la denominada resistencia al clopidogrel se considera como un factor de riesgo a ser tomado en cuenta seriamente. Una resistencia al clopidogrel se presenta cuando la función plaquetaria de un paciente no es influida por la administración de la dosis estándar de clopidogrel o lo es en grado mínimo. Mediante la determinación de la función plaquetaria se puede por un lado, comprobar si mediante la dosis escogida se logra un efecto antiplaquetario suficiente. Por otro lado, se pueden comprobar y tratar dosis o efectos demasiado altos de un medicamento antiplaquetario, lo que es muy importante por ejemplo, antes de intervenciones quirúrgicas, para excluir complicaciones por hemorragias.

Del estado de la técnica se conocen diferentes procesos para el análisis de la función plaquetaria. En el caso de la determinación del tiempo de sangría se trata de una prueba global in vivo que registra la hemostasis primaria. El

tiempo de sangría se determina practicando a los pacientes una pequeña herida de incisión o pinchazo y midiendo el tiempo hasta la detención de la hemorragia. Se trata de una prueba informativa aproximada, difícil de estandarizar, la cual se utiliza sobre todo en situaciones de emergencia, para obtener una vista general de la hemostasis primaria. La toma de inhibidores de la agregación plaquetaria conlleva una prolongación del tiempo de sangría. Es desventajoso en la determinación del tiempo de sangría que, en el caso de un tiempo normal de sangría, no pueda descartarse que exista oculta una disfunción de la función plaquetaria.

Diversos procedimientos in vitro posibilitan una comprobación esencialmente más sensible de alteraciones de la función plaquetaria. En estos procedimientos se induce, usualmente mediante una prueba de sangre entera o en una prueba de plasma rico en plaquetas (PRP), a la agregación plaquetaria mediante la administración de un activador. Los activadores más utilizados para la agregación plaquetaria son ADP (5'-adenosín difosfato), colágeno, epinefrina (adrenalina), ristocetina y diferentes combinaciones de ellos, así como trombina, TRAP (Thrombin-Receptor-Activating-Protein, o proteína activadora de receptor de trombina) o serotonina.

En el caso de la agregometría por transmisión de luz, también denominada agregación plaquetaria por el método de Born, se mide la capacidad de agregación de los trombocitos en plasma rico en plaquetas de manera fotométrica en un agregómetro ante la presencia de sustancias que inducen la agregación. Mediante la formación de agregados aumenta la transmitancia luminosa del análisis PRP, de tal manera que mediante la medición de la transmitancia luminosa se puede determinar, por ejemplo la velocidad de la formación de agregados. Por medio de la agregometría por transmisión de luz se puede registrar también el efecto terapéutico de inhibidores de agregación plaquetaria empleados en forma medicamentosa. Una desventaja de la agregometría por transmisión de luz es que sólo se puede emplear plasma rico en plaquetas como material de muestra. Al plasma rico en plaquetas le faltan no sólo componentes importantes de la sangre, como por ejemplo, los glóbulos rojos y blancos, sino que además, se requiere de una preparación previa de la prueba que demanda mucho tiempo y es vulnerable a error.

BIN XU ET AL ("Acyclic Analogues of Adenosine Biphosphates as P2Y Receptor Antagonists: Phosphate Substitution Leads to Multiple Pathways of Inhibition of Platelet Aggregation" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US, Bd. 45, 2002, páginas 5694-5709) revela asimismo un método para la detección del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(1), como por ejemplo, el MRS2395 (3-(2-cloro-6-metilaminopurin- 9-il)-2-(2,2-dimetil-propioniloximetil) propiléster de ácido 2,2-dimetil-propiónico), mediante la medición de la función plaquetaria, en donde la medición plaquetaria de determina con un agregómetro.

Se puso en práctica otro principio de prueba para determinar la función plaquetaria mediante un analizador de función plaquetaria (PFA-100® Dade Behring Marburg GmbH, Magdeburg, Alemania). El PFA-100® o sistema PFA-100® es una prueba in vitro de sangre entera automatizada y estandarizada, en la cual se mide la hemostasis primaria en condiciones de flujo y, de esta manera, en presencia de altas fuerzas de cizallamiento. Para la simulación de las condiciones de flujo y de las fuerzas de cizallamiento, en la forma que dominan en los vasos sanguíneos arteriales más pequeños, se genera en una celda especial de medición una presión baja de aproximadamente -40 mbar y la sangre entera citrada que se encuentra en un reservorio de prueba circula a través de un capilar que tiene un diámetro de aproximadamente 200 µm. El capilar desemboca en una celda de medición que se cierra mediante un elemento separador, por ejemplo, una membrana, la cual contiene una abertura capilar central, a través de la que pasa la sangre a causa de la presión baja. En la mayoría de los casos, la membrana se mezcla, al menos en el área de la apertura, con uno o una pluralidad de activadores plaquetarios, que inducen la agregación plaquetaria, de tal manera que la sangre que fluye a través de la membrana entra en contacto, en el área de la abertura, con las sustancias que inducen a la agregación. Como consecuencia de la adhesión inducida y de la agregación de los trombocitos, en el área de la abertura se forma un coágulo de trombocitos (trombo) que obstruye la abertura de la membrana y detiene la circulación de la sangre. En este sistema se mide el tiempo que se necesita hasta llegar a la oclusión de la abertura de la membrana. El, así denominado, tiempo de obturación se correlaciona con la capacidad funcional de los trombocitos. Por ejemplo en la patente WO 97/34698 se describe una celda de medición para su utilización en un procedimiento para determinar la capacidad funcional de los trombocitos mediante la determinación del tiempo de obturación. Hasta ahora en los procedimientos de determinación del tiempo de obturación se utilizan celdas de medición que están equipadas con una membrana que está cubierta con colágeno (Col) y adicionalmente, o con ADP, o con epinefrina (Epi). Diferentes elementos separadores, así como su fabricación y utilización se describen por ejemplo, en la patente EP 716 744 B1.

En MISCHKE R ET AL ("Influence of platelet count, acetylsalicylic acid, von Willebrand's Disease, coagulopathies and haematocrit on results obtained using a platelet function analyser in dogs." VETERINARY JOURNAL, Bd. 165, Nr.1, Januar 2003 (2003-01) páginas 43 y 52) se describe el sistema PFA-100, el cual contiene una membrana biológicamente activa con una abertura microscópica relativamente grande en el extremo de un capilar, en donde esta membrana está cubierta por colágeno y ADP. Al conducir sangre por la membrana se induce a la formación de un coágulo de trombocitos y, de esta manera, al cierre de esta abertura. Se mide el tiempo necesario para la formación del coágulo que genere el cierre de la apertura.

Según sea el equipamiento, se diferencian celdas de medición Col/ADP y celdas de medición Col/Epi. Usualmente se analiza la muestra de un paciente mediante una celda de medición Col/Epi. En el caso de un tiempo de obturación Col/Epi anormalmente prolongado que advierte sobre una alteración de la agregación plaquetaria, se realiza inmediatamente una medición Col/ADP. Si el tiempo de obturación Col/ADP también es anormalmente prolongado, esto es indicador de una disfunción de la función plaquetaria o una disfunción del factor de von Willebrand. Si por el contrario, el tiempo de obturación Col/ADP es normal, esto puede indicar la presencia de ácido acetilsalicílico o la existencia de una trombocitopatía adquirida o heredada, como por ejemplo, la Storage Pool Disease o síndrome de pool de depósito. Una desventaja del sistema PFA-100® reside en que las celdas de medición Col/ADP y Col/Epi disponibles presentan sólo una sensibilidad limitada al efecto inhibitorio de agregación de los inhibidores de agregación plaquetaria del grupo de la tienopiridina, (por ejemplo, clopidogrel y ticlopidina). Una determinación fiable del efecto terapéutico clopidogrel y ticlopidina de uso medicamentoso, particularmente si el paciente ha ingerido ASS en forma adicional (por ejemplo aspirina), no es posible hasta ahora con celdas de medición Col/ADP y Col/Epi en el sistema PFA-100®.

El documento WO 2005/007868 A2 describe otro procedimiento para la determinación de la función plaquetaria que posibilita la comprobación del efecto terapéutico de clopidogrel y otros antagonistas P2Y₁₂(12). En este procedimiento se mezcla la muestra de sangre entera de un paciente con un anticoagulante y se mezcla con ADP para la inducción de la agregación plaquetaria. Además, a la muestra se le agrega prostaglandina E1 (PGE 1). La prostaglandina E1, un producto del metabolismo del ácido araquidónico del ser humano tiene la capacidad ya en dosis bajas, de reducir notablemente la reactividad de los trombocitos y por eso se utiliza para la inhibición de la activación de los trombocitos. En los procedimientos de prueba descritos en la WO 2005/007868 A2 se utiliza PGE 1 para evitar la activación indeseada del receptor ADP P2Y₁(1) y para elevar con ello la especificidad del procedimiento de prueba para el receptor P2Y₁₂(12) o para antagonistas P2Y₁₂(12) como clopidogrel. Adicionalmente se agregan micropartículas, a las que están acopladas un ligando del receptor GPIIb/IIIa, como por ejemplo fibrinógeno y la reacción de agregación se mide mediante la creciente transmitancia luminosa de forma agregométrica. Es desventajoso en el procedimiento descrito que la función plaquetaria como en la agregometría de la transmisión luminosa, no se determine en la influencia de condiciones de flujo y fuerzas de cizallamiento.

La presente invención se basa en el objeto de presentar un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria en condiciones de flujo que también posibilite la determinación del efecto inhibitorio de agregación de los trombocitos de sustancias antagonistas P2Y₁₂(12). La revelación del objeto consiste en la realización de los procedimientos y objetos conformes a la invención descritos en las reivindicaciones.

Es objeto de la presente invención un procedimiento in vitro para la determinación de la función plaquetaria en una muestra de sangre entera. Preferentemente, en el caso de la prueba de sangre entera se trata de sangre recién extraída, venosa, anticoagulada, humana o animal, la cual debe ser examinada dentro de las 4 horas después de la extracción, mediante el procedimiento acorde a la invención. Preferentemente, la sangre es anticoagulada mediante anticoagulantes. Para la utilización de anticoagulantes son adecuadas las soluciones de citratos tamponados de enlace de calcio, como por ejemplo, soluciones de citrato de sodio tamponadas al 3,2 o 3,8 % así como también inhibidores directos de la trombina, naturales o sintéticos así como hirudina, PPACK (D-Phe-Pro-Arg-Clorometilcetona, HCl), argatroban y melagatran o inhibidores directos del factor Xa, naturales o sintéticos como antistasina, el péptido anticoagulante de garrapata: yagin, draculina, GGACK (H-Glu-Glu-Arg-clorometilcetona), inhibidores del factor diamidino Xa e inhibidores del factor mono-benzamidina Xa.

El procedimiento para la determinación de la función plaquetaria conforme a la invención comprende una pluralidad de fases del procedimiento. Para la simulación de las condiciones fisiológicas de flujo, como las que dominan en pequeñas arterias, primero la sangre, que se encuentra en una cámara de depósito, es conducida por un capilar que tiene preferentemente un diámetro de aproximadamente 200 µm. El capilar desemboca en una celda de medición que está subdividida mediante un elemento separador en dos compartimentos. El elemento separador presenta una abertura, a través de la cual la sangre es conducida desde el primer al segundo compartimento. El procedimiento conforme a la invención se caracteriza porque el elemento separador utilizado contiene un activador de receptores de adenosina, un activador de adenil ciclasas intracelulares, así como iones de calcio, por lo que la sangre que circula a través del elemento separador se pone en contacto con estas sustancias contenidas dentro o sobre el elemento separador. Como consecuencia de la agregación plaquetaria que es inducida mediante el contacto con las sustancias mencionadas, se forma un coágulo de trombocitos en la abertura del elemento separador. Se mide el tiempo necesario para la formación del coágulo en la apertura del elemento separador hasta el cierre oclusivo de la abertura. Preferentemente, se mide el tiempo de obturación del conducto utilizando un aparato que contenga un sensor de presión el cual determine la circulación de la sangre a través de la abertura durante la prueba. En este caso, después de una aspiración inicial rápida del volumen vacío de la celda de medición, se determina en primer lugar la tasa inicial de flujo. Preferentemente, el tiempo de obturación medido en la sangre entera de un paciente se compara con un valor de referencia del tiempo de obturación para sangre entera de un sujeto de estudio sano.

Preferentemente, el flujo de la sangre a través del capilar y de la abertura en el elemento separador se genera mediante la creación de una presión baja en la celda de medición, es decir, mediante aspiración. En una forma de

ejecución particularmente preferida la presión baja se genera por la interacción de un cartucho de prueba adecuado y un instrumento. Un ejemplo de sistema de ese tipo se describe, por ejemplo, en el documento WO 97/034698.

El elemento separador conforme a la invención empleado en el procedimiento de prueba contiene un activador de receptores de adenosina, preferentemente del grupo de la 5'-adenosina difosfato (ADP), 2-metilto-adenosina-5'-difosfato (2-MeSADP) y sus derivados. En una forma de ejecución preferida se utiliza un elemento separador que contiene una sal de ADP o una sal de 2-MeSADP. En una forma de ejecución preferida se utiliza un elemento separador que contiene 1 a 100 µg, de manera especialmente preferida, 1 a 50 µg y de manera absolutamente preferida 20 a 25 µg de ADP.

El elemento separador contiene además, un activador de adenil ciclasas (AC) intracelulares, preferentemente del grupo de la prostaglandina E1 (PGE 1), forskolina y sus derivados solubles en agua, prostaglandina 12 y sus derivados estables iloprost y cicaprost. En una forma de ejecución preferida se utiliza un elemento separador que contiene 1 a 1000 ng, en forma especialmente preferida 3 a 20 ng de prostaglandina E1. En otra forma de ejecución preferida se utiliza un elemento separador que contiene 0,1 a 10 µg, en forma especialmente preferida, 0,5 a 5 µg de forskolina.

En otra forma de ejecución especialmente preferida del procedimiento se utiliza un elemento separador que contiene ADP y prostaglandina E1.

Además, el elemento separador contiene en forma adicional iones de calcio, preferentemente en forma de dihidrato de cloruro de calcio. En otra forma de ejecución preferida se utiliza un elemento separador que contiene 50 a 200 µg, en forma especialmente preferida, 100 a 150 µg y de manera absolutamente preferida 125 µg de iones de calcio, preferentemente en forma de dihidrato de cloruro de calcio.

Se descubrió que en presencia de iones de calcio el efecto inhibidor de agregación de los trombocitos del ácido acetilsalicílico (ASS) se minimiza de tal manera que una determinación precisa del efecto inhibidor (antitrombótico) de agregación de los trombocitos de otros inhibidores de la agregación plaquetaria como por ejemplo, antagonistas P2Y(12) como clopidogrel son también posibles de realizar en muestras que ya contengan ASS. Un elemento separador conteniendo iones de calcio se utiliza en el procedimiento conforme a la invención, especialmente cuando la muestra de sangre entera a analizar está anticoagulada con anticoagulantes aglomerantes de calcio. Si la muestra de sangre entera a analizar está anticoagulada con antiaglomerantes de calcio, por ejemplo con un inhibidor directo de la trombina o del factor Xa, entonces la concentración interna de iones de calcio contenida en la propia prueba es suficiente como para reducir la disfunción plaquetaria inducida mediante ASS. Sin embargo, también en estos casos puede utilizarse un elemento separador que contenga iones de calcio.

El procedimiento conforme a la invención se utiliza de forma especialmente preferida para la determinación del efecto antitrombótico (inhibidor de agregación de los trombocitos) de un antagonista P2Y(12), particularmente para la determinación de un antagonista P2Y(12) del grupo de clopidogrel, ticlopidina, prasugrel (sinónimo: CS-747) y otras tienopiridinas, AR-C67085MX (5'-trifosfato de 2-propiltio-d-β,γ-diclorometileno-adenosina), cangrelor (sinónimo: ARC69931MX, ácido N6-[2-(metiltio)-etil]-2-(3,3,3-trifluoropropil)tio-5'-adenilo), C1330-7 (N1-(6-etoxi-1,3-benzotiazol-2-il-2-(7-etoxi-4-hidroxi-2,2-dioxo-2h-2-benzo[4,5][1,3]tiazolo[2,3-c][1,2,4]tiadiazin-3-il)-2-oxo-1-etansulfonamida), AZD 6140 (análogo de nucleósido), MRS 2395 (3-(2-cloro-6-metilaminopurin-9-il)-2-(2,2-dimetil-propioniloximetil) propiléster de ácido 2,2-dimetil-propiónico) y 2-MeSAMP (5'-monofosfato de 2-metiltoadenosina).

Sorprendentemente se descubrió además, que el procedimiento conforme a la invención puede ser utilizado para la determinación del efecto antitrombótico (inhibidor de agregación de los trombocitos) de un antagonista P2Y(1), particularmente para la determinación de un antagonista P2Y(1) del grupo MRS 2179 [sal de diamonio de 3',5'-difosfato de 2'-deoxi-N6-metiladenosina], MRS 2279 [3',5'-bifosfato de (N)-metanocarba-N6-metil-2-cloro-2'-desoxiadenosina], MRS 2500 [3',5'-bifosfato de 2-yodo-N6-metil-(N)-metanocarba-2'-desoxiadenosina], A2P5P [2',5'-bifosfato de adenosina], A3P5P [3',5'-bifosfato de adenosina] y A3P5PS [3'-fosfato,5'-fosfosulfato de adenosina].

Otro objeto de la presente invención consiste en un dispositivo adecuado para la determinación de la función plaquetaria en una muestra de sangre entera, en donde el dispositivo comprende a) una cámara de depósito para depositar la muestra, b) un capilar a través del cual se conduce la sangre desde la cámara de depósito hasta la celda de medición; c) una celda de medición subdividida en dos compartimentos mediante un elemento separador, en donde el primer compartimento recibe la sangre del capilar; d) un elemento separador que divide la celda de medición en dos compartimentos y que presenta una abertura, a través de la cual la sangre puede fluir desde el primer compartimento al segundo compartimento. El dispositivo se caracteriza porque presenta un activador de receptores de adenosina, un activador de adenil ciclasas (AC) intracelulares, iones de calcio, preferentemente en forma de dihidrato de cloruro de calcio.

El elemento separador es una matriz de soporte porosa o no porosa para recibir en su superficie un activador de receptores de adenosina, un activador de adenil ciclasas (AC) intracelulares y dado el caso, para iones de calcio.

Preferentemente, el elemento de separación se conforma en forma de una membrana. El material preferido para la membrana debería absorber líquidos, de tal manera que las sustancias mencionadas anteriormente pueden aplicarse en forma disuelta. Materiales especialmente preferidos son éster de celulosa, cerámica, nylon, polipropileno, poliétersulfona, polivinilidenofluoruro o PVDF. Preferentemente, el elemento separador preferido, humedecido e impregnado con las sustancias deseadas, se secará. A través del contacto de la sangre con el elemento separador, las sustancias del elemento separador se diluyen y se mezclan con la muestra de sangre.

El elemento separador presenta preferentemente, una abertura circular realizada a la matriz de soporte preferiblemente mediante punzonado. El diámetro de la abertura del elemento separador se dimensiona de tal manera que en las condiciones del presente procedimiento se pueda formar en el un coágulo que pueda obturar esa abertura y de esta manera, detener el flujo de sangre. Preferentemente, el diámetro de la abertura es de aproximadamente 100 μm y 200 μm . Especialmente, de manera preferida, el diámetro de la abertura es de alrededor de 100 μm .

Preferentemente, el dispositivo conforme a la invención está fabricado de tal manera que con la colaboración de un instrumento que interaccione con los componentes del dispositivo, pueda generarse una presión baja que ocasione que se presente un flujo de sangre desde la cámara de depósito hasta la celda de medición a través del capilar y de la propia abertura del elemento separador.

Además, la presente invención hace referencia a la utilización, en un procedimiento conforme a la invención, de un dispositivo para la determinación de la función plaquetaria. Una utilización preferida del dispositivo conforme a la invención consiste en su uso para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(12). Otra utilización preferida del dispositivo conforme a la invención consiste en su uso para la determinación del efecto antitrombótico (inhibidor de agregación de los trombocitos) de un antagonista P2Y(1).

Los siguientes ejemplos de ejecución sirven para ilustrar el procedimiento conforme a la invención y no se deben considerar limitantes del mismo.

Figuras

Figura 1

La figura 1 muestra, a modo de ejemplo, la forma en que puede estar equipado un dispositivo conforme a la invención para la determinación de la función plaquetaria. Se muestra un cartucho de prueba conforme al documento WO 97/34698 en un corte longitudinal, el cual está colocado en un instrumento adecuado para la realización del procedimiento conforme a la invención y en el cual se distingue un aparato de vacío (15) que es responsable de la generación de la presión baja. El aparato de vacío (15) presenta para ello una obturación (27) anular que está dispuesta herméticamente sobre el borde (12) saliente del envase de la prueba (10). El cartucho de prueba presenta una carcasa que conforma la cámara de depósito (61) y la cámara de prueba (63). La cámara de prueba (63) está fabricada para el alojamiento de un envase con la muestra, (10) cuyo lumen también puede denominarse como celda de medición. El envase de la prueba soporta un elemento separador (6) tratado con reactivos químicos con una abertura central (abertura) y una unión capilar (30 31) que produce una conexión del capilar con el envase de la prueba. La cámara del depósito (61) y la cámara de prueba (63) son separadas por un elemento penetrable (70). La figura 1 muestra una fase del ciclo de prueba, después de que el aparato de vacío (15) haya tocado el envase de la prueba (10) y lo desplazara hacia abajo, de tal manera que el fondo del envase de prueba (10) haya tocado el elemento de soporte (71) y el capilar (40) haya atravesado el elemento penetrable (70) y la prueba (11) haya sido penetrada. El instrumento provoca ahora una presión baja en el envase de prueba (10) a través del cual la sangre de prueba (11) se desplaza hacia arriba a través de los capilares (40) hacia el primer compartimento (18) de la celda de medición y seguidamente a través de la abertura en el elemento de separación (6).

Figura 2

Diagrama para la representación de los tiempos de obturación (en segundo[s]) para las muestras de sangre enteras normales, sin tratar (control) y para las muestras de sangre enteras mezcladas in vitro con antagonistas P2Y(12) MRS 2395, y/o el inhibidor de COX-1 ácido acetilsalicílico (ASS) (ver ejemplo 2). Se utilizaron muestras de sangre entera anticoagulada con citrato de sodio de 11 donantes sanos. En el lado izquierdo del diagrama se encuentran representados los valores medios y las desviaciones estándar de los tiempos de obturación registrados con los cartuchos de prueba ADP/PGE1/calcio conforme a la invención (cut off (valor de corte): 81 segundos). En el lado derecho del diagrama están representados los valores medios y las diferencias estándar de los tiempos de obturación que fueron registrados para su comparación con cartuchos de prueba Col/Epi convencionales (cut off: 158 segundos). La evaluación de rendimientos de las dos celdas de medición muestra que al utilizar una celda de medición ADP/PGE 1 conforme a la invención en pruebas que fueron mezcladas con el antagonista P2Y(12) MRS 2395 se miden tiempos de obturación que se encuentran notablemente por encima del valor de referencia superior

(cut off), mientras que las mismas pruebas en el caso de la utilización de una celda de medición Col/Epi se encuentran en su mayor parte por debajo del valor de referencia superior (cut off). Esto significa que el procedimiento conforme a la invención para la determinación de la función plaquetaria posibilita una determinación más sensible de una disfunción plaquetaria inducida por un antagonista P2Y(12) que el procedimiento comparativo del estado de la técnica.

Figura 3

Diagrama para la representación de los tiempos de obturación (en segundo[s]) para las muestras de sangre enteras sin tratar (control) y para las muestras de sangre enteras mezcladas in vitro con antagonistas P2Y(12)-MRS 2395, el antagonista P2Y(1) MRS 2179 o el inhibidor de COX-1 ácido acetilsalicílico (ASS) (ver ejemplo 4). Se utilizaron muestras de sangre entera de 10 donantes sanos anticoagulada con PPACK. En el diagrama están representados los valores medios y las diferencias estándar de los tiempos de obturación registrados con los cartuchos de prueba ADP/PGE1 conforme a la invención (cut off: 90 segundos). La evaluación de rendimientos muestra que en el caso de la utilización de una celda de medición ADP/PGE1 conforme a la invención en pruebas que fueron mezcladas con el antagonista P2Y(12) MRS 2395 o el antagonista P2Y(1) MRS 2179, se miden valores por encima del valor de referencia superior (cut off), mientras que en cambio, en las pruebas mezcladas con el inhibidor de COX-1 ácido acetilsalicílico (ASS) no hay prolongación de los tiempos de obturación y por tanto están por debajo del cut off.

Ejemplos

Ejemplo 1: fabricación de una celda de medición de ADP/PGE1/calcio conforme a la invención

Para la fabricación de un elemento de separación para un cartucho de prueba conforme a la invención se cortó en tiras una membrana de filtro de polietersulfona (Supor®-Membran, Pall GmbH, Dreieich, Alemania). Una solución que contiene 1 µL 7 µg/µL ADP (adenosina-5'-difosfato sal de potasio - 2H₂O, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) y 5 ng/pL PGE1 (prostaglandina E1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) y 367,5 µg/L CaCl₂ 2H₂O (corresponde a 100 µg/µL de iones Ca²⁺) se pipeteó en forma de puntos sobre la membrana y se secó la membrana. Seguidamente se cortó una abertura circular con un diámetro de 100 µm en el medio del área de la membrana cubierta por reactivos químicos. La membrana producida de esta manera se colocó como elemento separador en la celda de medición de un cartucho de prueba PFA-100® (Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania).

Ejemplo 2: utilización de una celda de medición de ADP/PGE1/calcio conforme a la invención para la determinación in vitro del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(12).

2a) Preparación de las muestras

Se le extrajo sangre a 11 donantes sanos y se anticoaguló con citrato de sodio (3,2 % citrato de Na tamponado).

Las alícuotas de muestras de sangre entera citrada se mezclaron in vitro con el antagonista P2Y(12) MRS 2395 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Para ello se mezcló una solución inicial etanólica de MRS 2395 (15 mg/mL) con las muestras de sangre entera, de tal manera que se obtuvo una concentración final de 100 µmol/L.

Otras alícuotas de muestras de sangre entera citrada se mezclaron in vitro con el inhibidor de COX-1 ácido acetilsalicílico (abreviatura: ASS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Para ello se mezcló una solución acuosa inicial de ASS (1 mg/mL) con las muestras de sangre entera, de tal manera que se obtuvo una concentración final de 30 µmol/L.

Otras alícuotas de muestras de sangre entera citrada se mezclaron in vitro con MRS 2395 y con ASS, de tal manera que se obtuvieron las concentraciones finales antes mencionadas.

Tras la adición de los reactivos químicos las pruebas de sangre se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2b) Determinación del efecto antitrombótico MRS 2395 mediante agregometría de transmitancia luminosa (según Born) inducida por ADP.

Para comprobar que las pruebas tratadas con MRS 2395 muestran efectivamente una agregación plaquetaria reducida se produjo plasma rico en plaquetas PPR y plasma pobre en plaquetas PPP a partir de alícuotas de las muestras de sangre descritas en el ejemplo 2, no tratadas y tratadas con MRS 2395 y las pruebas fueron mezcladas posteriormente con 2 µM ADP. Las pruebas PPP fueron utilizadas como control de valores vacíos. La medición

fotométrica de la reacción de agregación se tomó en el dispositivo coagulante automático BCT®(Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania) removiendo en forma continua (600 U/min.). La agregación plaquetaria de las muestras tratadas con MRS 2395 en comparación con la agregación plaquetaria de las muestras no tratadas fue inferior en un 27 %.

5 2c) Determinación del efecto antitrombótico MRS 2395 mediante el procedimiento conforme a la invención en condiciones de flujo.

Para la determinación del tiempo de obturación como medida de la función plaquetaria, las muestras de sangre entera descritas en el ejemplo 2a se analizaron mediante los cartuchos de prueba de ADP/PGE1/calcio conforme a la invención, descritos en el ejemplo 1 en un dispositivo PFA-100® (Platelet Function Analyzer-100, Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania). Para ello se agregaron 700 µL de una muestra de sangre en la cámara de depósito del cartucho de prueba precalentado (+37° C) e incubado en el dispositivo a 37° C durante 3 minutos. Posteriormente mediante el dispositivo se generó una presión baja de -40 mbar por la cual se aspiró la sangre de la cámara fuera del depósito a través de un capilar (diámetro 200 µm) y finalmente a través de una abertura del elemento de separación ingresó en la celda de medición. Como tiempo de obturación se determinó el tiempo necesario hasta la obturación de la abertura a través de la formación de un coágulo de sangre. Cada muestra se analizó dos veces y como valor de medida se tomó el valor medio de una doble determinación.

Con el fin de comparar las pruebas de sangre entera descritas en el ejemplo 2a se analizaron paralelamente con un cartucho de prueba conocido Col/Epi PFA-100® (2 µg de Colágeno y 10 µg Epinefrina sobre la membrana; 150 µm diámetro de apertura; Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania) en el dispositivo PFA-100® .

Los resultados de los análisis están resumidos en la figura 2 y en la correspondiente descripción de las figuras.

En la tabla 1 está representado individualmente para cuántas de las 11 muestras tratadas con MRS 2395 y/o con ácido acetilsalicílico se midió un tiempo de obturación por encima del cut off mediante el ADP/PGE1 conforme a la invención, o mediante la celda de medición convencional Col/Epi. En 9 de 11 muestras tratadas con MRS 2395 se mide, mediante el procedimiento conforme a la invención, una agregación plaquetaria anormalmente reducida, mientras que mediante el procedimiento convencional sólo se clasifican como anormales 4 de las 11 muestras. Eso significa que el procedimiento conforme a la invención presenta una sensibilidad elevada para una disfunción plaquetaria inducida con un antagonista P2Y(12). Es además ventajoso que el procedimiento conforme a la invención, en presencia de iones de calcio libres, presenta una reducida sensibilidad para ácidos acetilsalicílicos. Sólo en una sola muestra de 11 tratadas con ácidos acetilsalicílicos se mide una agregación plaquetaria anormalmente reducida, mientras que por el contrario con la celda de medición convencional Col/Epi 8 de las 11 muestras tratadas con ácidos acetilsalicílicos se determinan como anormales. Las muestras que se tratan con MRS 2395 y con ácidos acetilsalicílicos se clasifican como 100% anormales mediante el procedimiento convencional, mientras que con el procedimiento conforme a la invención sólo 9 de 11 muestras (como en el caso de la sola adición de MRS 2395) se clasifican como anormales. A causa de su elevada sensibilidad para disfunciones plaquetarias inducidas con antagonistas P2Y(12) y su reducida sensibilidad para disfunciones plaquetarias inducidas con ácidos acetilsalicílicos, el procedimiento conforme a la invención es adecuado para la diferenciación de ambas clases de antitrombóticos .

Tabla 1

Prueba	Cantidad de pruebas con tiempo de obturación por encima del cut off (n=11)		
	MRS 2395 (Antagonista P2Y (12))	ácido acetilsalicílico Inhibidor COX-1	MRS 2395+ Ácido acetilsalicílico
Celda de medición			
ADP/ PGE 1	9	1	9
Col/Epi	4	8	11

2d) Determinación del valor de referencia para cartuchos de prueba Col/Epi y ADP/PGE

Se extrajo sangre venosa a donantes sanos y se la anticoaguló con citrato de sodio (3,2 citrato de sodio tamponado). Para cada muestra de sangre entera la determinación del tiempo de obturación se realizó en el dispositivo PFA-100®. Con el cartucho de prueba Col/Epi PFA-100® [ver ejemplo 2c)] se analizaron muestras de 180 donantes con doble determinación. Con un cartucho de prueba de ADP/PGE1/calcio [ver ejemplos 1 y 2c)] se analizaron muestras de 159 donantes con doble determinación.

El valor de referencia (valores normales) para el tiempo de obturación Col/Epi o para el tiempo de obturación ADP/PGE1 se fijó determinando un rango de medición en el cual se encontraban el 90% de los valores medidos que habían sido determinados para los sujetos de prueba sanos (90% de intervalos centrales de la distribución normal de todas las mediciones). De esta manera, se obtuvieron los siguientes valores de referencia para los tiempos de obturación:

Col/Epi 70- 178 segundos

ADP/PGE 1 46- 81 segundos

Como cut off, es decir, como valor de corte límite para una disfunción plaquetaria se estableció el valor de corte superior del valor de referencia. Si varía el tiempo de obturación del valor de referencia de una muestra de un paciente, esto puede indicar una alteración de la función plaquetaria. Es decir, los tiempos de obturación Col/Epi mayores a 178 segundos o tiempos de obturación ADP/PGE 1 mayores a 81 segundos indican la presencia de una disfunción plaquetaria en el sentido de una capacidad de agregación disminuida.

Ejemplo 3: utilización de una celda de medición ADP/PGE 1 conforme a la invención para la determinación del efecto antitrombótico del antagonista P2Y (12) clopidogrel ex vivo.

A 13 pacientes que sufrían de una enfermedad oclusiva arterial periférica y que habían sido tratados durante un período de tiempo de por lo menos 4 semanas con una dosis diaria de 75 mg de clopidogrel (Plavix®, Sanofi-Aventis) como único antitrombótico, se les extrajo sangre venosa y se la anticoaguló con citrato de sodio (3,8 % citrato de Na tamponado). Las muestras se analizaron mediante diferentes procedimientos para la determinación de la función plaquetaria:

- conforme a la invención en condiciones de flujo y utilización de un cartucho de prueba de calcio ADP/PGE1 PFA-100® (ver ejemplos 1 y 2c). Cut off: > 81 segundos;
- en condiciones de flujo y un cartucho de prueba PFA-100® el cual se diferenciaba del cartucho de prueba conforme a la invención según el ejemplo 1 porque no contenía PGE1, cut off: > 78 segundos
- mediante agregometría por transmisión de luz inducida por ADP (según Born) con adición de 2 µM ADP (ver ejemplo 2b), cut off: < 40 transmisión de luz al final de la prueba;
- mediante agregometría por transmisión de luz inducida por ADP (según Born) con adición de 5 µM ADP (ver ejemplo 2b), cut off: < 40 transmisión de luz al final de la prueba. Este procedimiento es recomendado por Sanofi-Aventis, el fabricante del preparado de clopidogrel Plavix® para la determinación del efecto antitrombótico del medicamento.

Los cut offs para los procedimientos individuales se determinaron mediante ensayos previos con sangre entera o de plasma de donantes sin patología hemostática.

La tabla 2 representa en forma individual con cuál de los cuatro procedimientos de las 13 pruebas en pacientes se pudo comprobar un efecto antitrombótico de clopidogrel. "+" significa se comprobó un efecto antitrombótico; "-" significa que no se pudo comprobar un efecto antitrombótico. "0" significa que la doble determinación arrojó resultados contradictorios, es decir, un valor por encima y uno por debajo del cut off.

Tabla 2

Procedimiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Sensibilidad
1.) ADP/PGE1	-	0	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	77%
2.) ADP	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	46%

(continuación)

Procedimiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Sensibilidad
3.) Agregometría 2 μ M ADP	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	69%
4.) Agregometría 5 μ M ADP	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	62%

5 Mediante el procedimiento conforme a la invención se pudo comprobar en 10 de 13 pacientes (77%) el efecto antitrombótico de la ingestión de clopidogrel. En el caso de un paciente (paciente N° 2) la doble determinación arrojó resultados contradictorios, mientras que en el caso de dos pacientes (pacientes N° 1 y 6) no se pudo comprobar una capacidad de agregación plaquetaria reducida. Sin embargo, en estos dos pacientes no se pudo comprobar el efecto de la ingestión de clopidogrel con ninguno de los métodos empleados.

10 El procedimiento acorde a la invención es más sensible con respecto a la disfunción de la función plaquetaria inducida a través de clopidogrel que el método estándar de la agregometría por transmisión de luz inducida por ADP según Born y más sensible que el procedimiento en el cual se utiliza un cartucho de prueba que contiene ADP y que no contiene PGE1.

Ejemplo 4: utilización de una celda de medición ADP/PGE 1 conforme a la invención para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y (12) y un antagonista P2Y (1) in vitro.

15 **4a) Preparación de la prueba**

Se extrajo sangre venosa a 10 pacientes sanos y se la anticoaguló con 75 μ M PPACK.

Las alícuotas de muestras de sangre entera se mezclaron in vitro con el antagonista P2Y(12) MRS 2395 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Para ello se mezcló una solución inicial etanólica de MRS 2395(15 mg/mL) con las muestras de sangre entera, de tal manera que se obtuvo una concentración final de 150 μ mol/L.

20 Otras alícuotas de muestras de sangre entera se mezclaron in vitro con el inhibidor de COX-1 ácido acetilsalicílico (abreviatura: ASS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Para ello se mezcló una solución acuosa inicial de ASS (1 mg/mL) con las muestras de sangre entera de tal manera que se obtuvo una concentración final de 30 μ mol/L.

25 Otras alícuotas de muestras de sangre entera se mezclaron in vitro con el antagonista P2Y(1) MRS 2179 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Para ello se mezcló una solución acuosa inicial MRS 2179 (1 mg/mL) con las muestras de sangre entera, de tal manera que se obtuvo una concentración final de 75 μ mol/L.

Tras la adición de los reactivos químicos las pruebas de sangre se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

30 **Ejemplo 4b) Determinación del efecto antitrombótico de MRS 2395 y MRS 2179 mediante el procedimiento conforme a la invención en condiciones de flujo**

35 Para la determinación del tiempo de obturación como medida de la función plaquetaria, las muestras de sangre entera descritas en el ejemplo 2a se analizaron mediante los cartuchos de prueba ADP/PGE1/ conforme a la invención en un dispositivo PFA-100® (Platelet Function Analyzer-100, Dade Behring Marburg GmbH, Marburgo, Alemania). El cartucho de prueba conforme a la invención ADP/PGE1/ utilizado se fabricó esencialmente como se describe en el ejemplo 1, sin embargo sin que se mezclara con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El cartucho de prueba recibió entonces 7 μ g de ADP y 5 ng PGE1, pero no iones de calcio.

40 Se agregaron 700 μ L de una muestra de sangre en la cámara de depósito del cartucho de prueba precalentado (+37° C) y se la incubó en el dispositivo a 37° C durante 3 minutos. Posteriormente, mediante el dispositivo se generó una presión baja de -40 mbar, por la cual se aspiró la sangre de la cámara fuera del depósito a través de un capilar (diámetro 200 μ m) y finalmente a través de una abertura del elemento de separación ingresó en la celda de medición. Como tiempo de obturación se determinó el tiempo necesario hasta la obturación de la abertura mediante

la formación de un coágulo de sangre. Cada muestra se analizó dos veces y como valor de medida se tomó el valor medio de una doble determinación.

Los resultados de los análisis están resumidos en la figura 3 y en la correspondiente descripción de las figuras.

- 5 En la tabla 3 está representado individualmente para cuántas de las correspondientes muestras tratadas con 10 MRS 2395 2179 y/o con ácido acetilsalicílico se midió mediante la celda de medición ADP/PGE1 conforme a la invención un tiempo de obturación por encima del cut off. En 9 muestras de 10 tratadas con 10 MRS 2395 y en 10 de 10 tratadas con MRS 2170 se midió mediante el procedimiento conforme a la invención una agregación plaquetaria anormalmente reducida, mientras que ninguna de las muestras tratadas con ácido acetilsalicílico se clasificó como anormal. Esto significa que el procedimiento conforme a la invención presenta una sensibilidad elevada tanto para una disfunción plaquetaria inducida con un antagonista P2Y(12) como para una disfunción plaquetaria inducida con un antagonista P2Y(1). Es además ventajoso que el procedimiento conforme a la invención en presencia de iones de calcio libres presentara una sensibilidad reducida para el ácido acetilsalicílico.

- 15 De esta manera, a causa de su elevada sensibilidad para disfunciones plaquetarias inducidas con antagonistas de los receptores ADP y su reducida sensibilidad para disfunciones plaquetarias inducidas con ácidos acetilsalicílicos el procedimiento conforme a la invención es apto para la diferenciación de ambas clases de antitrombóticos.

Tabla 3

		Cantidad de pruebas con tiempo de obturación por encima del cut off (n=10)		
Celda de Medición	Prueba	MRS 2395 (Antagonista P2Y (12))	Ácido acetilsalicílico (Inhibidor COX-1)	MRS 2179 (Antagonista P2Y (1))
		9	0	10

4c) Determinación del cut off para cartuchos de prueba ADP/PGE

- 20 A causa del empleo de PPACK como anticoagulante, no puede ser utilizado el cut off con sangre entera citrada de los ejemplos antes representados. Por eso el valor de referencia para el tiempo de obturación ADP/PGE1 de las 10 pruebas de los donantes sanos tratadas con PPACK se determinó mediante el 90% del intervalo central de una distribución normal de los valores medios de la doble determinación. De esta manera se obtuvieron los siguientes valores de referencia para el tiempo de obturación:

ADP/PGE 51- 90 segundos.

- 25 El límite superior del 90% del intervalo central se estableció como cut off, es decir, como valor de corte para una disfunción plaquetaria.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la función plaquetaria en una muestra de sangre entera, en donde el procedimiento comprende los siguientes pasos:

- 5 a) Conducción de la sangre a través de un capilar y posteriormente a través de una abertura del elemento separador y;
- b) Medición del tiempo que se necesita para la formación de un coágulo de trombocitos en la abertura del elemento separador hasta la obturación de la abertura;

caracterizado porque el elemento separador contiene

- i) un activador de receptores de adenosina;
- 10 ii) un activador de adenil ciclasas intracelulares del grupo de la prostaglandina E1, forskolina, prostaglandina 12, y sus derivados estables iloprost y cicaprost; y
- iii) iones de calcio

2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 **caracterizado porque** el elemento separador utilizado contiene un activador de receptores de adenosina del grupo de 5'-difosfato de adenosina, 2-metiltio-adenosina-5'-difosfato.

15 3. Procedimiento conforme a la invención conforme a una de las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizado porque** la muestra de sangre entera es anticoagulada con un inhibidor directo de la trombina.

4. Procedimiento conforme a la invención conforme a una de las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizado porque** la muestra de sangre entera es anticoagulada con un inhibidor directo de factor Xa .

20 5. Procedimiento conforme a la invención conforme a una de las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizado porque** la muestra de sangre entera es anticoagulada con citrato.

6. Utilización de un procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5 para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(12).

25 7. Utilización conforme a la reivindicación 6 para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(12) del grupo de clopidogrel, ticlopidina, prasugrel, AR-C67085MX, cangrelor, C1330-7 MRS2395 y 5'-monofosfato de 2-metiltioadenosina.

8. Utilización de un procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5 para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(1).

9. Utilización conforme a la reivindicación 8 para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(1) del grupo de MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P y A3P5PS.

30 10. Dispositivo para la determinación de la función plaquetaria en una muestra de sangre entera, en donde el dispositivo comprende los siguientes elementos:

- a) Una cámara de depósito para alojar la muestra;
- b) Un capilar a través del cual la sangre es conducida desde la cámara de depósito a una celda de medición;
- c) Una celda de medición, la cual está subdividida mediante un elemento separador en dos compartimentos, en
35 donde el primer compartimento recibe la sangre del capilar;
- d) Un elemento separador que subdivide la celda de medición en dos compartimentos y que presenta una abertura a través de la cual la sangre puede fluir desde el primer compartimento al segundo compartimento;

caracterizado porque el elemento separador contiene

- i) un activador de receptores de adenosina;

ii) un activador de adenilciclasas intracelulares del grupo de la prostaglandina E1, forskolina, prostaglandina 12, y sus derivados estables iloprost y cicaprost; y

iii) iones de calcio

5 **11.** Utilización de un dispositivo conforme a la reivindicación 10 en un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria.

12. Utilización de un dispositivo conforme a una de las reivindicaciones 10 y 11 en un procedimiento para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(12).

13. Utilización de un dispositivo conforme a una de las reivindicaciones 10 y 11 en un procedimiento para la determinación del efecto antitrombótico de un antagonista P2Y(1).

10

FIGURA 1

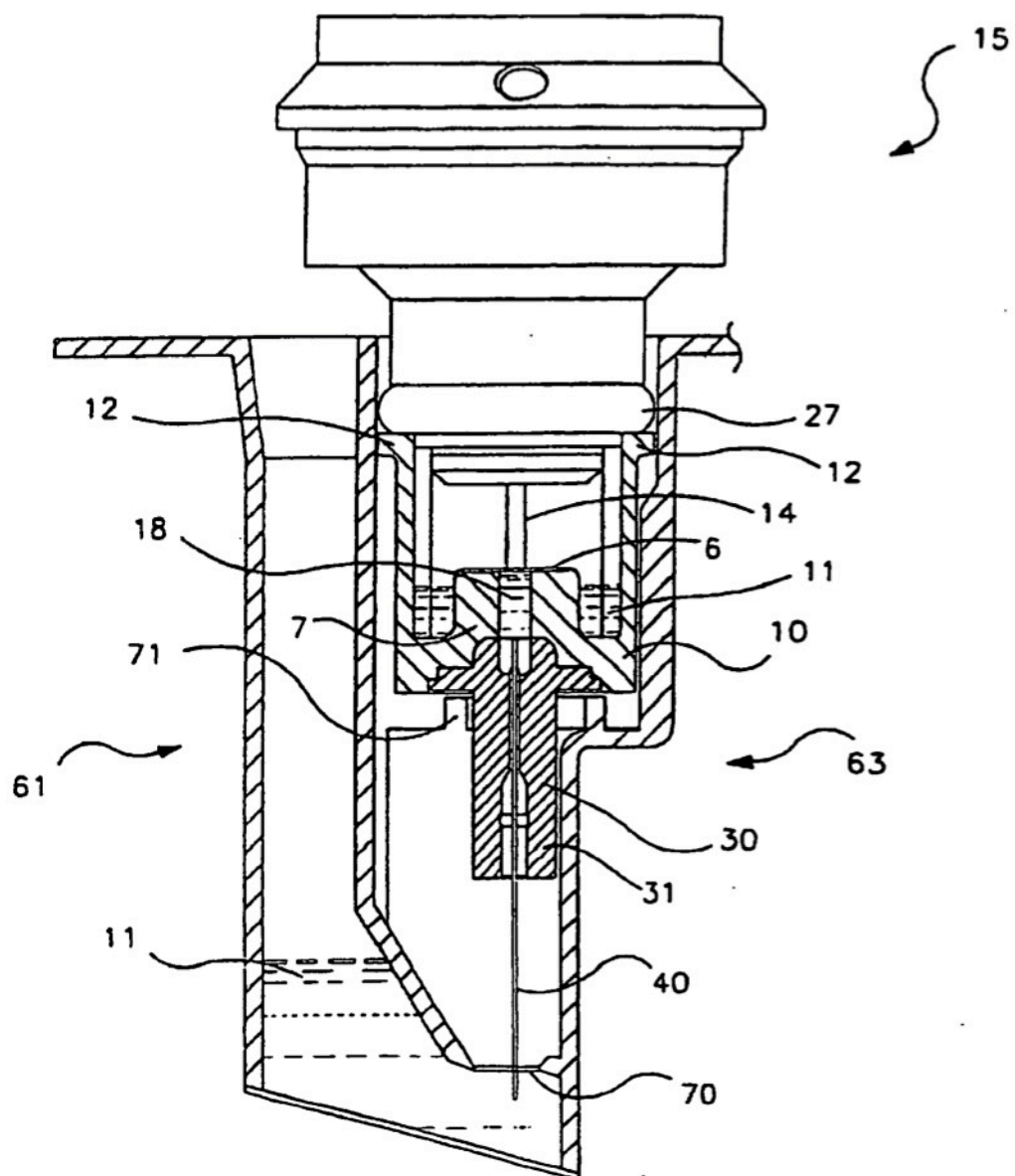


FIGURA 2

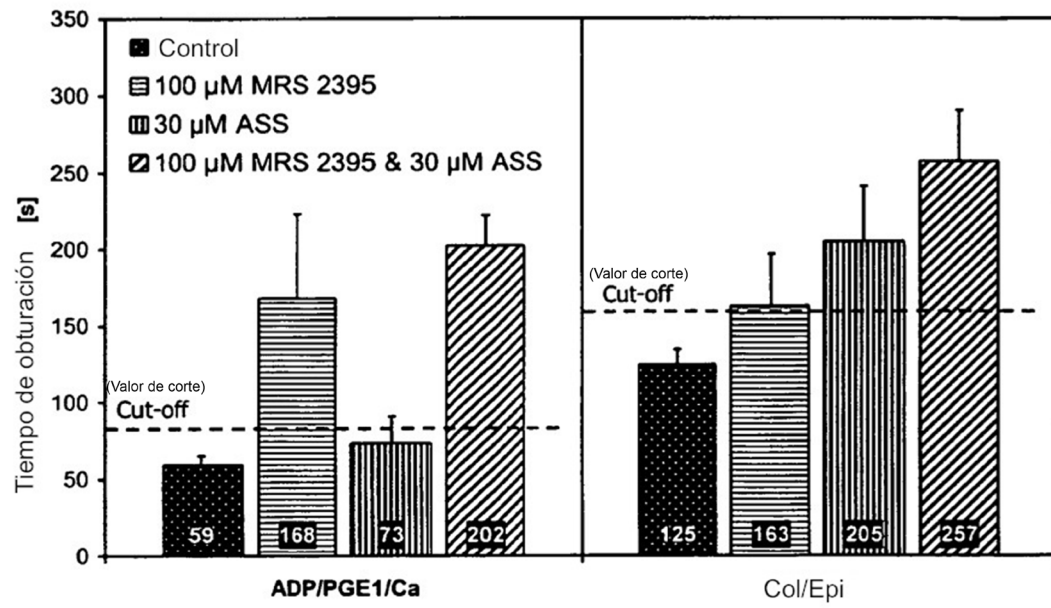


FIGURA 3

