

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 718**

51 Int. Cl.:

G01N 11/16 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2004 E 04716470 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1601976**

54 Título: **Protocolo para controlar la inhibición plaquetaria**

30 Prioridad:

07.03.2003 US 384345

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

03.09.2015

73 Titular/es:

**CORA HEALTHCARE, INC. (100.0%)
6225 W. HOWARD STREET
NILES, IL 60714, US**

72 Inventor/es:

**COHEN, ELI y
NAVICKAS, IRENE A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 544 718 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

Protocolo para controlar la inhibición plaquetaria

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un protocolo para controlar la eficacia de agentes antiplaquetarios.

Antecedentes de la invención

10

La sangre es el tejido circulatorio de un organismo que transporta oxígeno y materiales nutritivos a los tejidos y retira el dióxido de carbono y diversos productos metabólicos para su excreción. La sangre completa consiste en un fluido de color amarillo claro o amarillo grisáceo, el plasma, en el que se suspenden glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

15

Una medición precisa de la hemostasia, es decir, la capacidad de la sangre de un paciente para coagularse y disolverse, de una manera sincronizada y eficaz es crucial para determinados procedimientos quirúrgicos y médicos. La detección acelerada (rápida) y precisa de anomalías en la hemostasia también es particularmente importante al respecto de administrar a los pacientes que padecen trastornos de la hemostasia un tratamiento adecuado y a los que puede ser necesario administrar anticoagulantes, agentes antifibrinolíticos, agentes trombolíticos, agentes antiplaquetarios o componentes de la sangre en una cantidad que debe determinarse claramente después de tener en cuenta los componentes, células o "factores" anormales de la sangre del paciente que pueden estar contribuyendo al trastorno de la hemostasia.

20

25

La hemostasia es un proceso dinámico extremadamente complejo que implica muchos factores intervinientes, que incluyen la coagulación y proteínas fibrinolíticas, activadores, inhibidores y elementos celulares, tales como el citoesqueleto de las plaquetas, los gránulos citoplasmáticos de las plaquetas y las superficies celulares de las plaquetas. Como resultado, durante la activación, ningún factor permanece estático o funciona de manera aislada. Por lo tanto, para que sea completa, es necesario medir de manera continua todas las fases de la hemostasia del paciente como un producto neto de componentes de sangre completa de un modo no aislado, o estático. Para dar un ejemplo de las consecuencias de la medida de una parte aislada de la hemostasia, asúmase que un paciente desarrolla fibrinólisis, que está causada por la activación de plasminógeno en plasmina, una enzima que deshace el coágulo. En este escenario, un subproducto de este proceso de producto de degradación de fibrinógeno (FDP), se comporta como un anticoagulante. Si solo se ensaya la anticoagulación en el paciente y se trata de manera consecuyente, este paciente puede seguir en riesgo debido a no estar en tratamiento con agentes antifibrinolíticos.

30

35

El resultado final del proceso de hemostasia es una red tridimensional de fibras de fibrina (o fibrinógeno) polimerizadas que junto con la unión al receptor de glucoproteína IIb/IIIa de plaquetas (GPIIb/IIIa) forma el coágulo final (FIG. 1). Una propiedad única de esta estructura de red es que se comporta como un sólido rígido elástico, capaz de resistir estrés de cizalla deformante de la sangre circulante. La fuerza del coágulo final para resistir estrés de cizalla deformante se determina mediante la estructura y densidad de la red de fibra de fibrina y mediante las fuerzas ejercidas por las plaquetas intervinientes.

40

45

Se ha demostrado que las plaquetas afectan a la fuerza mecánica de la fibrina de al menos dos maneras. En primer lugar, actuando como puntos de ramificación de nodos, potencian de manera significativa la rigidez de la estructura de fibrina. En segundo lugar, ejerciendo una fuerza "de tracción" sobre las fibras mediante la capacidad de contracción de la actomiosina de las plaquetas, una proteína muscular que es parte de un aparato de capacidad de contracción mediado por el citoesqueleto. La fuerza de esta capacidad de contracción potencia además la fuerza de la estructura de fibrina. El receptor de plaquetas GPIIb/IIIa parece ser crucial para anclar fibras polimerizantes al aparato contráctil subyacente del citoesqueleto en las plaquetas activadas, mediando de este modo la transferencia de la fuerza mecánica.

50

55

Por lo tanto, el coágulo que se desarrolla y adhiere al sistema vascular dañado como resultado de la hemostasia activada y resiste el estrés de cizalla de la sangre circulante es, en esencia, un dispositivo mecánico, formado para proporcionar un "tapón temporal" que resiste la fuerza de cizalla de la sangre circulante durante la recuperación vascular. La cinética, fuerza, y estabilizada del coágulo, que es su propiedad física para resistir la fuerza de cizalla deformante de la sangre circulante, determina su capacidad para efectuar el trabajo de la hemostasia, que es detener la hemorragia sin permitir una trombosis inadecuada. Esto es exactamente para lo que el sistema Thrombelastograph® (TEG®), descrito más adelante, se diseñó para que midiese, que es el tiempo que tarda la formación inicial de fibrina, el tiempo que tarda el coágulo en alcanzar su máxima fuerza, la fuerza máxima real, y la estabilidad del coágulo.

60

65

Se han conocido dispositivos analizadores de la hemostasia desde que el Profesor Helmut Harterd desarrolló dicho dispositivo en Alemania en la década de 1940. Se describe un tipo de analizador de la hemostasia en la Patente de cesión común de Estados Unidos N° 5.223.227. El documento W00196879 describe métodos de determinación de terapia antiplaquetaria usando dos muestras de sangre. Este instrumento, el analizador de hemostasia TEG®,

5 controla las propiedades elásticas de la sangre ya que se induce la coagulación en un ambiente de baja cizalla similar al flujo sanguíneo venoso lento. Los patrones de cambios en la elasticidad de cizalla del coágulo en desarrollo permiten la determinación de la cinética de la formación de coágulos, así como de la fuerza y estabilidad del coágulo formado; en pocas palabras, las propiedades mecánicas del coágulo en desarrollo. Tal como se ha descrito anteriormente, la cinética, la fuerza y la estabilidad del coágulo proporciona información acerca de la capacidad del coágulo para realizar "trabajo mecánico", es decir, resistir el estrés de cizalla deformante de la sangre en circulación; en esencia, el coágulo es la máquina elemental de la hemostasia, y el analizador TEG® mide la capacidad del coágulo para efectuar trabajo mecánico a lo largo de su desarrollo estructural. El sistema TEG® mide de manera continua todas las fases de la hemostasia del paciente como un producto neto de componentes de la sangre completa de una manera no aislada, o estática a partir del momento de inicio de la prueba hasta la formación inicial de fibrina, mediante la velocidad de fortalecimiento del coágulo y en último lugar la fuerza del coágulo mediante la unión de fibrina-plaquetas mediante los receptores de GPIIb/IIIa de las plaquetas y la lisis del coágulo.

15 Las plaquetas juegan un papel crucial mediando complicaciones isquémicas en pacientes protrombóticos (trombófilos). El uso de agentes inhibidores de GPIIb/IIIa en pacientes trombófilos o como adjunto a la angioplastia coronaria percutánea (PTCA) se está convirtiendo rápidamente en el estándar de cuidado. La inhibición del receptor de GPIIb/IIIa es una forma extremadamente potente de terapia antiplaquetaria que puede dar como resultado una reducción del riesgo de muerte y de infarto de miocardio, pero también puede dar como resultado un grave riesgo de hemorragia. El motivo para el potencial de sangrado o la no obtención de un nivel terapéutico adecuado de inhibición plaquetaria es el algoritmo de tratamiento de bloqueante plaquetario ajustado mediante el peso que se usa a pesar del hecho de que hay una variabilidad de persona a persona considerable. Este problema se debe en parte a las diferencias en los recuentos plaquetarios y a la variabilidad en el número de receptores de GPIIb/IIIa por plaqueta y sus funciones de unión a ligando.

25 Desde la introducción clínica del fragmento de anticuerpo Fab quimérico murino/humano c7E3 (abciximab, ReoPro®), también se han aprobado varias formas sintéticas de antagonistas de GPIIb/IIIa tales como Aggrastat® (tirofiban) e Integrilin® (eptifibatida), dando como resultado un aumento en el uso de terapia inhibidora de GPIIb/IIIa en procedimientos intervencivos de cardiología.

30 Antes de la introducción del método y el aparato descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 09/591.371 anteriormente mencionada, no había una prueba rápida, fiable y cuantitativa para controlar el bloqueo terapéutico de plaquetas en el punto de atención. Aunque se ha usado la prueba de agregación turbidimétrica para medir el grado de bloqueo del receptor de GPIIb/IIIa en estudios clínicos pequeños y en estudios de búsqueda de dosis, no ha sido factible su uso clínico rutinario para dosificar antagonistas de receptor de GPIIb/IIIa en pacientes individuales. La agregación lleva tiempo (más de una hora), cara de ejecutar, requiere personal especializado para llevarla a cabo, y no está fácilmente disponible a cualquier hora del día; por lo tanto, no puede emplearse en el centro de atención para el control rutinario del paciente y la individualización de la dosis. Para que sea clínicamente útil, un ensayo de inhibición de plaquetas tiene que proporcionar información rápida y fiable referente al bloqueo del receptor a pie de cama, permitiendo de este modo la modificación de la dosis para lograr el efecto antiplaquetario deseado.

45 La prueba de agregación turbidimétrica se basa en el principio fotométrico, que controla el cambio en la densidad óptica del espécimen. Inicialmente, una mínima cantidad de luz pasa a través del espécimen, ya que las plaquetas funcionales están activadas mediante la prueba turbidimétrica; la agregación plaquetaria sucede mediante la unión del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas a fibrina (o fibrinógeno), tal como se ilustra en la Figura 1, y por tanto aumenta la transmisión de la luz. Cuando las plaquetas se inhiben mediante el bloqueo del receptor de GPIIb/IIIa, la transmisión de luz aumenta proporcionalmente.

50 Otro sistema comercialmente disponible mide la unión de fibrinógeno-plaquetas usando perlas recubiertas con una cantidad fija de una fuente externa de fibrinógeno "normal". Por lo tanto, este sistema usa una fuente no del paciente de fibrinógeno "normal" y no puede detectar un paciente en estado protrombótico (con hipercoagulación) debido a un nivel mayor de fibrinógeno en el paciente, o detectar un estado hemorrágico (con hipocoagulación) debido a un nivel bajo de fibrinógeno en el paciente. Además, este sistema muestra solo la unión, sin detección de la rotura de esa unión. Por lo tanto, en presencia de trombolisis, la evaluación del bloqueo del receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas por el sistema puede no ser precisa.

60 La unión de fibrinógeno-GPIIb/IIIa de plaquetas es la fase inicial de la agregación plaquetaria, o un tapón de plaquetas de hemostasia primaria, que se desarrolla hasta formar la unión de fibrina-plaquetas final. Por lo tanto, no es suficiente medir únicamente el estado inicial de la unión de fibrinógeno-plaqueta, que puede no reflejar de manera precisa la unión final de fibrina-plaqueta a través del receptor de GPIIb/IIIa. Aunque los sistemas turbidimétricos y otros fotométricos detectan el inicio de la agregación plaquetaria mediante la unión de fibrinógeno-receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas, puede no reflejar de manera precisa la unión final de fibrina-plaqueta a través del receptor de GPIIb/IIIa.

65 De manera significativa, entre las limitaciones de los sistemas que usan perlas recubiertas con fibrinógeno "normal" está que este fibrinógeno "normal" puede no reflejar ni la cantidad o la funcionalidad del fibrinógeno propio de un

paciente. Por lo tanto, el bloqueo del fibrinógeno-receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas medido mediante dichos sistemas solo es una estimación aproximada del bloqueo individual de fibrinógeno-GPIIb/IIIa de plaquetas del paciente de la fase inicial de la agregación plaquetaria.

5 Esta es una limitación significativa en determinados subgrupos de pacientes de alto riesgo, que pueden necesitar tratamiento con un agente para la inhibición de plaquetas, pueden tener un nivel mayor o menor de fibrinógeno y por lo tanto necesitarían una evaluación precisa del bloqueo de GPIIb/IIIa de plaquetas para reducir las complicaciones de sangrado debido a una subestimación del bloqueo de receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas, o a sucesos isquémicos debidos a una sobreestimación del bloqueo del receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas. Además, el nivel y la funcionalidad del fibrinógeno pueden cambiar durante un traumatismo o procedimientos intervencionistas. En ese momento es imperativo efectuar una evaluación precisa del bloqueo del receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas en tiempo real, durante y después del procedimiento.

15 Por lo tanto, existe la necesidad de un método y un aparato para medir la eficacia de agentes antiplaquetarios, de manera continua y durante el proceso completo de la hemostasia, desde la formación inicial del coágulo hasta su lisis.

Breve descripción de los dibujos

20 La FIG. 1 es una ilustración gráfica que representa el mecanismo de agregación plaquetaria.
 La FIG. 2 es un diagrama esquemático de un analizador de hemostasia de acuerdo con una realización preferida de la invención.
 La FIG. 3 es una gráfica que ilustra un perfil de hemostasia generado por el analizador de hemostasia mostrado en la FIG. 2.
 25 Las FIG. 4-10 son ilustraciones esquemáticas que ilustran la activación plaquetaria que responde a diversos agentes agonistas.
 La FIG. 11 ilustra varios perfiles de hemostasia que se refieren a la activación plaquetaria descrita en conexión con las FIG. 4-10.
 La FIG. 12 es un diagrama esquemático de un analizador de hemostasia de acuerdo con una realización alternativa de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

35 El alcance de protección está limitado únicamente por las reivindicaciones.
 De acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención, un analizador de la hemostasia, tal como el analizador de la hemostasia Thrombelastograph® (TEG®) disponible a través de Haemoscope Corp., Skokie, Illinois, se utiliza para medir de manera continua en tiempo real el proceso de la hemostasia desde la formación inicial de fibrina, hasta la unión de plaquetas-GPIIb/IIIa de fibrina y su lisis. Aunque en el presente documento se discuten varios agentes antiplaquetarios específicos en relación a las realizaciones preferidas de la invención, se apreciará que la invención tiene aplicación en relación a virtualmente cualquier agente antiplaquetario. Además, se apreciará adicionalmente que la invención tiene aplicación para medir la eficacia de la potenciación de la coagulación o de agentes activadores de las plaquetas.
 45 De acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención, el uso del analizador de la hemostasia de acuerdo con el protocolo de la invención permite: la confirmación de la obtención de nivel terapéutico del bloqueo del receptor de GPIIb/IIIa; la evaluación individualizada de la dosis para evaluar la obtención del bloqueo adecuado del receptor de GPIIb/IIIa; la evaluación individualizada de la dosificación necesaria para alcanzar un bloqueo adecuado del receptor de GPIIb/IIIa; la ilustración de la velocidad de disminución de inhibición de plaquetas o la recuperación de la inhibición después del tratamiento con fármacos para la inhibición de plaquetas; la evaluación del efecto de interacción de una combinación de agentes trombolíticos e inhibidores de plaquetas, en la hemostasia del paciente.

La presente invención puede usar un analizador 10 de la hemostasia, tal como el analizador de la hemostasia Thrombelastograph® (TEG®) citado anteriormente, para medir las propiedades físicas del coágulo. Se describe un analizador 10 ilustrativo en detalle en la Patente de Estados Unidos Nº 6.225.126, y no se repite una discusión completa en el presente documento. En referencia a la FIG. 2, para ayudar a entender la invención, sin embargo, se proporciona una breve descripción del analizador 10 de la hemostasia. El analizador de la hemostasia usa un vaso cilíndrico estacionario 12 especial que retiene una muestra de sangre 13. El vaso 12 se acopla a un mecanismo de tracción que hace que el vaso oscile en un ángulo de 0, preferentemente de aproximadamente 4°45'. Cada ciclo de rotación dura 10 segundos. Se suspende una punta 14 en la muestra de sangre 13 mediante un cable de torsión 15, y se controla el movimiento de la punta 14. En esfuerzo de torsión del vaso rotatorio 12 se transmite a la punta sumergida 14 solo después de que la unión de fibrina-plaquetas haya unido el vaso 12 y la punta 14. La fuerza de estas uniones fibrina-plaqueta afecta a la magnitud del movimiento de la punta, de tal forma que los coágulos fuertes mueven la punta 14 directamente en fase con el movimiento del vaso. Por lo tanto, la magnitud del rendimiento está relacionada directamente con al fuerza del coágulo formado. A medida que se retrae o rompe el coágulo, estas uniones se rompen y disminuye la transferencia del movimiento del vaso.

El movimiento rotatorio de la punta 14 se convierte mediante un transductor 16 en una señal eléctrica, que puede controlarse mediante un ordenador (no mostrado en la FIG. 2) que incluye un procesador y un programa de control.

- 5 El ordenador funciona con la señal eléctrica para crear un perfil de hemostasia correspondiente al proceso de coagulación medido. Además, el ordenador puede incluir una pantalla de visualización o acoplarse a una impresora para proporcionar una representación visual del perfil de hemostasia. Dicha configuración del ordenador se encuentra dentro de las capacidades de un experto habitual en la técnica.
- 10 Como también se describirá, basándose en una evaluación del perfil de hemostasia, el ordenador, mediante su programa de control, puede adaptarse para proporcionar recomendaciones de dosis. Tal como se muestra en la FIG. 3, el perfil de hemostasia 20 resultante es una medida del tiempo que tarda en formarse la primera hebra de fibrina, la cinética de la formación de coágulos, la fuerza del coágulo (medida en milímetros (mm) y convertida a unidades de elasticidad de cizalla de din/cm^2) y la disolución del coágulo. La Tabla I, a continuación, proporciona definiciones para varios de estos parámetros medidos.

Tabla I

R	El tiempo R es el periodo de tiempo de latencia desde el momento en que se puso la sangre en el analizador TEG® hasta la formación inicial de fibrina.
α	α mide la rapidez de la formación y reticulación de la fibrina (fortalecimiento del coágulo)
MA	MA, o amplitud máxima en mm, es una función de las propiedades dinámicas máximas de la unión de fibrina y plaquetas a través de GPIIb/IIIa y representa en última instancia la fuerza del coágulo de fibrina.
LY30	LY30 mide la velocidad de reducción de la amplitud 30 minutos después de MA y representa la retracción del coágulo, o su lisis.

15 Clínicamente, estas medidas proporcionan un vehículo para controlar la terapia anti-coagulante (por ejemplo, heparina o warfarina), terapia trombolítica (por ejemplo, tPA, estreptocinasa, urocinasa), efecto de antifibrinolíticos (por ejemplo, ácido ϵ -amino-caproico (Amicar®), trasilol (aprotinina), ácido tranexámico (TX)), efectos de agentes anti-plaquetarios (por ejemplo, abciximab (ReoPro®), eptifibatida (Integrilin®), tirofiban (Aggrastat®), terapia de transfusión de componentes de la sangre, evaluación del riesgo trombótico en el cáncer e infección, cirugía de alto riesgo y otras afecciones que podrían dar lugar posiblemente a una coagulación excesiva (afecciones de hipercoagulación) o de sangrado excesivo (afecciones de hipocoagulación). De acuerdo con la invención, por lo tanto, el analizador de la hemostasia 10 es útil para ensayar la eficacia clínica de la terapia con fármacos para detener la fibrinólisis, o la eficacia de fármacos trombolíticos para controlar la trombolisis, la eficacia de agentes antiplaquetarios para controlar la inhibición plaquetaria, complicaciones isquémicas o de sangrado.

20 Cuantitativamente, el analizador 10 de la hemostasia y el ordenador asociado representan la fuerza del coágulo frente al tiempo, donde el inicio de la formación del coágulo, el tiempo de reacción (R), están indicados (FIG. 3). Esta gráfica también indica la fuerza máxima del coágulo (o rigidez), MA, de una muestra de sangre. MA es una estimación general de la unión de plaquetas-GPIIb/IIIa de fibrina, que se usa, por ejemplo, para guiar la terapia de reemplazo de plaquetas o fibrinógeno post-operatoria. Entre plaquetas y solo fibrina, un MA anormalmente bajo implica que hay una anomalía en las plaquetas (es decir, un defecto cuantitativo o funcional) y/o una anomalía en el contenido de fibrinógeno en la sangre. Sin embargo, al mantener constante el nivel de fibrinógeno y el número de plaquetas, cualquier cambio en el MA reflejará cambios en la función de las plaquetas. Por lo tanto, al ensayar la misma muestra de sangre de dos maneras distintas, una con un agente antiplaquetario y una sin, la diferencia entre los dos MA refleja el efecto del agente antiplaquetario en la función de las plaquetas.

25 Las plaquetas juegan un papel crítico en la mediación de complicaciones isquémicas que dan como resultado ictus e infarto de miocardio. La inhibición de la función plaquetaria mediante agentes antiplaquetarios (fármacos bloqueantes de plaquetas) tales como aspirina, el fragmento Fab de anticuerpo c7E3, abciximab (ReoPro®), o clopidogrel (Plavix®), puede dar como resultado una disminución dramática del riesgo de muerte, infarto de miocardio, o reoclusión después de angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) o terapia trombolítica intra-arterial (IATT). La administración de cantidades excesivas de agentes anti-plaquetarios puede dar lugar a hemorragias con riesgo de muerte. Por lo tanto, es muy importante una estimación precisa de la inhibición de la función plaquetaria en un paciente dado para controlar la terapia farmacológica debido a la estrecha relación riesgo/efecto terapéutico en esta clase de fármacos.

30 Usando la estrategia anterior, que mantiene constante el nivel de fibrinógeno y el número de plaquetas, es posible administrar adecuadamente y controlar agentes antiplaquetarios o modificar sus dosificaciones, o medir la contribución de fibrina al MA (MA_{FIB}) y restando medir la contribución pura de las plaquetas al MA (MA_P) como $MA_P = MA - MA_{FIB}$.

35 Por lo tanto, de acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención, para controlar de manera adecuada agentes anti-plaquetarios, se sigue el siguiente procedimiento:

1. El analizador 10 de la hemostasia, tal como se usa de manera común, mide la función plaquetaria (MA o MA_P) que es estimulada por trombina, un potente activador de plaquetas que activa directamente el sitio del receptor GPIIb/IIIa. Para sensibilizar al MA o MA_P a una pequeña inhibición de la función plaquetaria, la función plaquetaria debe activarse mediante un activador de plaquetas menos potente que la trombina, tal como ADP, que activa indirectamente el sitio del receptor de GPIIb/IIIa. Por lo tanto, cuando se ejecutan muestras de sangre en el analizador 10 de la hemostasia en este caso, la formación de trombina se inhibe con, por ejemplo, citrato de sodio, heparina, herudina, etc., y en cambio se usa ADP para activar la función plaquetaria.

2. Desafortunadamente, la trombina también está implicada en la activación de la conversión de fibrinógeno a fibrina. Al haber inhibido la formación de trombina en la etapa 1, es necesario usar otra enzima para activar el fibrinógeno. La reptilasa, cuya única función es la de activar la conversión de fibrinógeno a fibrina, es una enzima adecuada. Ahora el coágulo se estimula mediante reptilasa (activación de fibrinógeno) y ADP (activación plaquetaria). La fuerza del coágulo se mide mediante el MA, y la contribución de la función plaquetaria a la fuerza del coágulo se mide mediante el MA_P, tal como se describe anteriormente.

3. El coágulo que se forma por un activador de fibrinógeno, tal como reptilasa y un activador de plaquetas, tal como ADP es típicamente más débil que el desarrollado por trombina. Por lo tanto, el cable de torsión 15 descrito anteriormente puede seleccionarse para que sea sensible a un coágulo más débil y para que sea capaz de medir los cambios en el MA y el MA_P debido al pequeño efecto de los agentes antiplaquetarios, tales como ReoPro®. Como alternativa, puede añadirse Factor XIII activado (Factor XIIIa). El Factor XIIIa provoca una modificación de la unión de fibrina-plaquetas desde enlace de hidrógeno hasta enlaces covalentes más fuertes, potenciando la fuerza del coágulo.

Basándose en lo anterior, puede implementarse el siguiente protocolo:

1. Modificación del cable de torsión del analizador 10 de la hemostasia según sea necesario: al producir cables de torsión de diferente fuerza para diversas sensibilidades a fuerzas de cizalla para medir de manera adecuada los efectos de agentes antiplaquetarios de diversas potencias. La sensibilidad del cable de torsión está generalmente relacionada con su calibre. Para una sensibilidad aumentada, los cables de torsión que tienen calibres para detectar la sensibilidad del coágulo en un intervalo de desde aproximadamente 150 a aproximadamente 1000 din/cm² son adecuados para su adaptación al analizador de hemostasia descrito en la Patente de Estados Unidos 6.225.236.

2. Muestra de sangre activada por agonista activado por reptilasa: Se usará batroxabina (reptilasa, Pentapharm) (15 µl de reactivo de reptilasa reconstituido) y se añade con anterioridad al vaso 12 para activar fibrinógeno a fibrina. Además de batroxabina, se añadirá previamente ADP (concentración final 20 µM) al vaso 12 junto con 10 µl de Factor XIIIa. Se añadirán 340 µl de sangre completa inhibida para trombina (por ejemplo, citrada, heparinizada, etc.) al vaso 12 precalentado que contiene batroxabina, ADP y Factor XIIIa, y se evaluará la fuerza máxima del coágulo. Además, también se llevará a cabo una prueba de control con batroxabina y un agente antiplaquetario que se añade al vaso 12, dando como resultado una inhibición completa de la contribución de las plaquetas a la fuerza del coágulo (MA_{FIB}), proporcionando una medida de la contribución de fibrina en ausencia del efecto aumentador de las plaquetas a la fuerza del coágulo.

MA_{PB} se mide antes de tratar al paciente con el agente antiplaquetario y se mide el MA_{PA} después del tratamiento. Se calculará la inhibición plaquetaria debido al efecto del fármaco del modo siguiente:

$$MA_{PB} = MA_B - MA_{FIB}$$

$$MA_{PA} = MA_A - MA_{FIB}$$

$$\text{Inhibición de fármaco} = MA_{PB} - MA_{PA}$$

Los expertos en la materia apreciarán que medir la fuerza de un coágulo tal como se describe anteriormente puede requerir un cable de torsión que sea sensible al coágulo típicamente más débil formado en condiciones de inhibición de trombina. Sin embargo, pueden usarse diferentes protocolos de ensayo para coágulos que tienen fuerzas en intervalos mayores o iguales a los coágulos típicos basados en trombina. En dichos casos, el cable de torsión 15 se seleccionará para que sea sensible a dichos coágulos más fuertes. Por lo tanto, pueden usarse cables de torsión de diversos calibres que proporcionen un intervalo de sensibilidades de entre aproximadamente 100 din/cm² a 25.000 din/cm².

Debe apreciarse además que la invención tiene aplicación para medir otros parámetros de la formación de coágulos. Por ejemplo, el analizador 10 de la hemostasia mide el proceso de coagulación sanguínea desde el momento del comienzo de la prueba hasta la formación inicial de fibrina, mediante la velocidad de fortalecimiento del coágulo y la lisis del coágulo. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, es posible medir el efecto de la presencia de heparina midiendo el parámetro R, que como se describe anteriormente, indica la inhibición en la formación inicial de fibrina.

También es posible medir la eficacia de la terapia farmacológica en la actividad trombolítica observando el parámetro LY30, que indica la velocidad de lisis del coágulo.

Está bien documentado que hay una variabilidad considerable de una persona a otra en el número de receptores de GPIIb/IIIa por plaqueta y su función de unión a ligando. Además, la inhibición variable de la función de GPIIb/IIIa, en parte debida a las diferencias en el recuento de plaquetas, puede producirse después de la administración de una dosis fija, ajustada por peso de un bloqueante de plaquetas. Los subgrupos de pacientes de mayor riesgo, tales como pacientes diabéticos que se someten a angioplastia coronaria percutánea (PTCA), pueden necesitar dosis mayores de inhibición plaquetaria de lo que se logra actualmente después de terapia bloqueante de plaquetas ajustada por peso, que en este momento no se individualiza para asegurar la obtención de un bloqueo adecuado del receptor de GPIIb/IIIa. El potencial de sucesos hemorrágicos o isquémicos sugiere la necesidad de una evaluación y una proyección individualizada de la dosificación necesaria para asegurar la obtención de un nivel terapéutico de bloqueo del receptor, en tiempo real. El aparato y el método de acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención proporcionan esta capacidad.

A diferencia de los agentes inhibidores del receptor de GPIIb/IIIa de plaquetas, Plavix® (clopidogrel) es un antagonista del receptor de adenosin difosfato (ADP) de plaquetas, que inhibe a una clase de receptores de ADP que median la activación de receptores de GPIIb/IIIa de plaquetas. Plavix® se toma por vía oral, normalmente en forma de una dosis inicial de cuatro comprimidos de 75 mg seguido de una terapia a largo plazo de un comprimido de 75 mg antes y después de la PTCA o para pacientes que tienen un riesgo elevado de sucesos isquémicos. El algoritmo de Plavix® dicta la misma dosificación independientemente del peso del paciente o del perfil hemostático. En consecuencia, el tratamiento con Plavix® puede dar como resultado un aumento del sangrado o no obtener un nivel terapéutico adecuado de inhibición plaquetaria. Por lo tanto, existe la necesidad de prescribir y controlar una dosis individualizada de agentes inhibidores tanto de receptor de GPIIb/IIIa como de ADP de plaquetas (PI).

Otro agonista de plaquetas es el tromboxano A_2 (TxA_2) que activa al receptor de tromboxano A_2 . Una vez se han activado los receptores de tromboxano A_2 , median la activación de los receptores de GPIIb/IIIa. La ciclooxigenasa es la enzima necesaria en la producción de tromboxano A_2 , y se inhibe mediante fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

El resultado de la proteína de coagulación activada es la hebra de fibrina que, junto con plaquetas activadas en GPIIb/IIIa, forma la unión de fibrina (o fibrinógeno) a plaquetas para producir el coágulo final. Por lo tanto, para que suceda la unión entre plaquetas y fibrina (o fibrinógeno) tienen que activarse los receptores de GPIIb/IIIa. Por lo tanto, los agonistas plaquetarios se construyen hacia la activación directamente del receptor de GPIIb/IIIa, como por trombina, o indirectamente, como por ADP y tromboxano A_2 . Por consiguiente, los fármacos inhibidores de plaquetas se dirigen específicamente hacia la inhibición de estos agonistas, tal como se ilustra en las FIG. 4-10.

En referencia a las FIG. 4-10, una plaqueta 30 tiene un sitio de receptor de GPIIb/IIIa 32, un sitio de receptor de ADP 34 y un sitio de receptor de TxA_2 36. Tal como se muestra en la FIG. 4, la adición de agonista de ADP activa al sitio del receptor de ADP 34 (ilustrado por la flecha 38), que activa al sitio del receptor de GPIIb/IIIa (ilustrado por la flecha 40). Un antagonista del receptor de adenosin difosfato (ADP) de plaquetas, tal como Plavix®, inhibe al sitio del receptor de ADP 34 (flecha discontinua 42 en la FIG. 5), y por lo tanto el sitio de GPIIb/IIIa no se activa en respuesta a la presencia del agonista de ADP (flecha discontinua 44). Por lo tanto, en presencia de un antagonista de receptor de ADP, un agonista de ADP solo activa las plaquetas que no están inhibidas. El resultado es una reducción en la fuerza del coágulo, ilustrado como el trazado MA_{pi} en la FIG. 11 en comparación con la fuerza del coágulo con activación completa de plaquetas ilustrado como el trazado MA_{kh} en la FIG. 11.

ReoPro®, Integrilin®, y Aggrastat® inhiben al receptor de GPIIb/IIIa 32 directamente. Cuando se añade agonista de ADP, este activa al receptor de ADP 34 (flecha 46 en la FIG. 6) pero se detiene en el receptor de GPIIb/IIIa (flecha discontinua 48). Por lo tanto, en presencia de inhibidores de GPIIb/IIIa, solo se activarán las plaquetas no inhibidas por el agonista de ADP, dando como resultado una fuerza del coágulo reducida de manera correspondiente, por ejemplo, MA_{pi} ilustrado en la FIG. 11.

El tromboxano A_2 activa al receptor de TxA_2 36 de plaquetas (flecha 50 en la FIG. 7), que a su vez activa al receptor de GPIIb/IIIa 32 (flecha 52). El ácido araquidónico (AA) es un precursor de tromboxano A_2 y se convierte en tromboxano A_2 en presencia de ciclooxigenasa. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) inhiben a la ciclooxigenasa (flecha discontinua 54 en la FIG. 8), y por lo tanto el sitio de GPIIb/IIIa tampoco se activa en presencia de un agonista de TxA_2 (flecha discontinua 56), dando como resultado una reducción correspondiente en la fuerza del coágulo, por ejemplo, MA_{pi} en la FIG. 11. Por lo tanto, un agonista de plaquetas de AA solo puede activar el sitio de GPIIb/IIIa 32 cuando no se toman AINE.

La trombina es la enzima que escinde al fibrinógeno soluble en hebras de fibrina. También es el activador de plaquetas más potente, aumentando fuerte y directamente la expresión y activación de receptores de GPIIb/IIIa de plaquetas (flecha 58 en la FIG. 9). Los agentes ReoPro®, Integrilin®, y Aggrastat® inhiben a los receptores de GPIIb/IIIa que responden a agonistas de ADP o de TxA_2 ; sin embargo, la trombina seguirá dando como resultado la activación de GPIIb/IIIa (flecha 60 en la FIG. 10). Determinados ensayos de hemostasia, tales como el ensayo

TEG® anteriormente citado, pueden configurarse para producir trombina en el proceso de formación del coágulo. La expresión aumentada y la fuerte activación de GPIIb/IIIa de plaquetas por trombina superan a los inhibidores de GPIIb/IIIa para proporcionar una fuerza de coágulo de activación completa de plaquetas (MA_{kh} en la FIG. 11).

5 Con la discusión anterior, es posible, por lo tanto, especificar adicionalmente un protocolo para controlar los inhibidores de plaquetas, tales como inhibidores plaquetarios de GPIIb/IIIa, ADP y tromboxano A_2 . En referencia a la FIG. 12, un aparato 10' puede incluir una diversidad de dispositivos de análisis de la hemostasia, tales como el analizador 10 de la hemostasia mostrado en la FIG. 2, y cuatro se muestran como dispositivos 10a, 10b, 10c y 10d, para ensayar respectivamente las muestras de sangre correspondientes 13a, 13b, 13c y 13d.

10 Se prepara una primera muestra de sangre completa heparinizada 13a y se carga en el primer analizador 10a de la hemostasia. Se añade un activador de fibrina 17, tal como una combinación de reptilasa y Factor XIIIa al vaso de muestra 12. El activador 17 puede añadirse previamente al vaso de muestra 12 p el vaso 12 puede tratarse con el activador 17. Como alternativa, el activador 17 puede añadirse a la muestra de sangre 13a después de que esta se añada al vaso 12. Se añaden aproximadamente 10 μ l de activador 17 a una muestra de sangre de 340 μ l. El ensayo se completa y se mide la fuerza del coágulo resultante. Esta fuerza del coágulo puede citarse como MA_f , ya que solo representa la contribución de la fibrina sin activación sustancial de plaquetas a la vista de la ausencia de cualquier agonista de plaquetas.

15 Se prepara una segunda muestra de sangre completa heparinizada 13b y se carga en el segundo analizador 10b de la hemostasia. Cabe señalar que puede usarse un analizador de hemostasia de una sola celda en serie para cada uno de los ensayos, puede usarse más de un analizador de una sola celda, o pueden usarse analizadores multicelda. Por ejemplo, el analizador de la hemostasia TEG® en configuración estándar tiene dos celdas de ensayo, que pueden funcionar simultáneamente. Pueden usarse dos analizadores de la hemostasia TEG® para llevar a cabo cada uno de los cuatro ensayos de acuerdo con este protocolo ilustrativo o puede usarse un analizador de la hemostasia TEG®. Además, los dos analizadores de la hemostasia TEG® pueden estar interconectados, formando esencialmente un solo dispositivo de ensayo de cuatro celdas.

20 Para la segunda muestra 13b, se añade el activador 17 a la muestra, y también se añade un agonista de ADP 18 en la proporción adecuada a la segunda muestra 13b. Por ejemplo, puede añadirse agonista de ADP 20 μ M a una segunda muestra de 340 μ l de sangre completa heparinizada. El ensayo se completa y se mide la fuerza del coágulo resultante. Esta fuerza del coágulo puede citarse como MA_{pi1} , ya que representa las contribuciones de la fibrina y las plaquetas no inhibidas mediante cualquier agente de inhibición de ADP de plaquetas que se haya administrado.

25 Se prepara una tercera muestra de sangre completa heparinizada 13c y se carga en el tercer analizador 10c de la hemostasia. El activador de fibrina 17 se añade a la muestra 13c, y se añade un agonista de tromboxano A_2 19 en una proporción adecuada a la tercera muestra 13c. Por ejemplo, pueden añadirse 10 μ l de ácido araquidónico (AA) a una tercera muestra de 340 μ l de sangre completa heparinizada. El ensayo se completa y se mide la fuerza del coágulo resultante. Esta fuerza del coágulo puede citarse como MA_{pi2} , ya que representa las contribuciones de la fibrina y las plaquetas no inhibidas mediante un agente de inhibición de TxA_2 de plaquetas que se haya administrado.

30 Se prepara una cuarta muestra de sangre completa heparinizada 13d y se carga en el cuarto analizador 10d de la hemostasia. Para la cuarta muestra 13d, se usan heparinasa 21 y caolín 22 para neutralizar el efecto de la heparina en la cuarta muestra 13d. El ensayo se completa y se mide la fuerza del coágulo resultante. Esta fuerza del coágulo puede citarse como MA_{kh} , y mide el MA máximo con activación plaquetaria debido al uso de heparinasa y caolín para neutralizar la heparina en la muestra 13d y para permitir la producción de trombina, que activa a los receptores de GPIIb/IIIa.

35 El valor $MA_{pi}-MA_f$ mide las contribuciones únicas de las plaquetas no inhibidas por agentes PI donde la inhibición plaquetaria puede ser por inhibición con Reopro®, Aggrastat®, Integrilin®, ADP y AINE. Después se calcula un porcentaje de reducción en el MA debido a la inhibición plaquetaria para cada uno de MA_{pi1} y MA_{pi2} de acuerdo con la ecuación:

40

$$55 \quad \text{Porcentaje de activación plaquetaria} = [(MA_{pij} - MA_f) / (MA_{kh} - MA_f)] * 100,$$

donde el valor $MA_{kh}-MA_f$ mide las contribuciones únicas de las plaquetas totalmente activadas. Por lo tanto, el practicante médico puede observar el efecto de la terapia de inhibición plaquetaria, aislada en efectos de componentes, y consecuentemente efectuar recomendaciones de dosis. Como alternativa, el porcentaje de inhibición plaquetaria puede determinarse como $100 - [(MA_{pij} - MA_f) / (MA_{kh} - MA_f)] * 100$.

60 Se apreciará que los vasos 12 de muestra en los ensayos anteriores pueden prepararse por adelantado para que contengan los agentes adecuados de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito. A este respecto, los vasos de muestra pueden codificarse por colores para identificar los agentes particulares contenidos en el vaso. Pueden envasarse conjuntos de vasos 12 de muestra para facilitar los ensayos. Además, los materiales agentes, por ejemplo, el activador 17, pueden distribuirse en viales codificados por colores para facilitar su identificación y para su

carga en los vasos 12 de muestra bien antes o después de cargar la muestra de sangre correspondiente en el vaso de muestra.

5 La invención se ha descrito en términos de diversas realizaciones preferidas. Un experto en la materia apreciará que la invención puede realizarse de otro modo sin apartarse de su alcance justo, que se expone en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

- 5 una primera muestra de sangre con un activador de fibrina que comprende al menos uno del grupo de reptilasa y Factor XIIIa, y ensayar la primera muestra de sangre para determinar una característica de la primera muestra de sangre en ausencia sustancial de activación plaquetaria, en el que la primera característica de la muestra de sangre representa una contribución de la fibrina a la homeostasis;
- 10 una segunda muestra de sangre con un activador del sitio de ADP o un activador del sitio de tromboxano A₂, y ensayar la segunda muestra de sangre para determinar una característica de la segunda muestra de sangre en presencia de una terapia antiplaquetaria, en el que la segunda característica de la muestra de sangre representa una contribución a la homeostasis de las plaquetas activadas en presencia de terapia antiplaquetaria;
- 15 una tercera muestra de sangre para neutralizar la terapia anticoagulante y para determinar una característica de la tercera muestra de sangre en presencia de activación plaquetaria sustancialmente desinhibida, en el que la característica de la tercera muestra de sangre representa una contribución a la hemostasia de la activación plaquetaria sustancialmente completa;
- y determinar un parámetro indicador de la eficacia de la terapia antiplaquetaria basándose en la primera, la segunda y la tercera característica de la muestra de sangre.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el parámetro comprende un porcentaje de activación plaquetaria.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el activador de ADP comprende un agonista de ADP.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el activador del sitio de tromboxano A₂ comprende ácido araquidónico.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de preparar la tercera muestra de sangre para neutralizar la terapia anticoagulante comprende administrar al menos uno de caolín y heparinasa.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende ensayar de manera sustancialmente simultánea la primera, la segunda y la tercera muestra de sangre.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, que comprende proporcionar un primero, un segundo y un tercer analizador de la hemostasia, y ensayar simultáneamente la primera, la segunda y la tercera muestra de sangre.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que el primero, el segundo y el tercer analizador de la hemostasia comprende una primera, una segunda y una tercera celda de ensayo de un solo analizador de la hemostasia.

GpIIb - IIIa

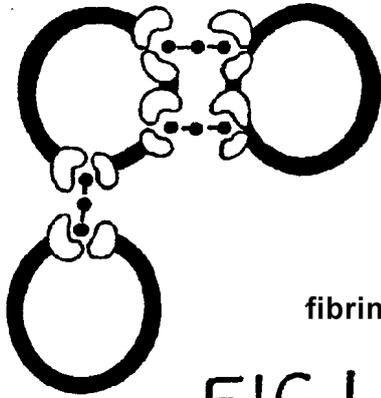


FIG.1

Plaqueta

fibrina (o fibrinógeno)

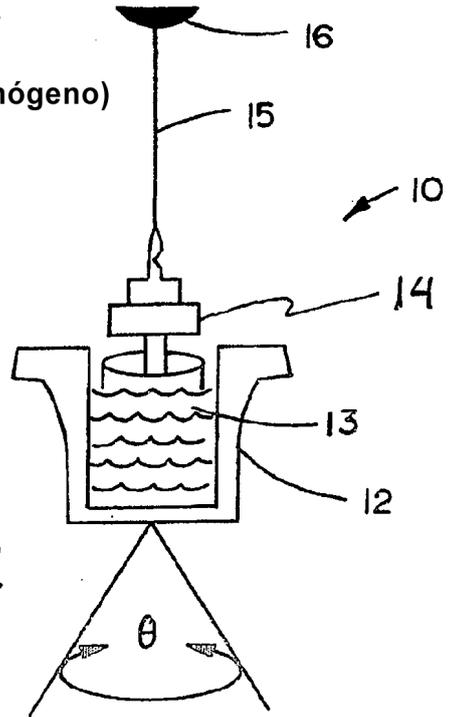


FIG.2

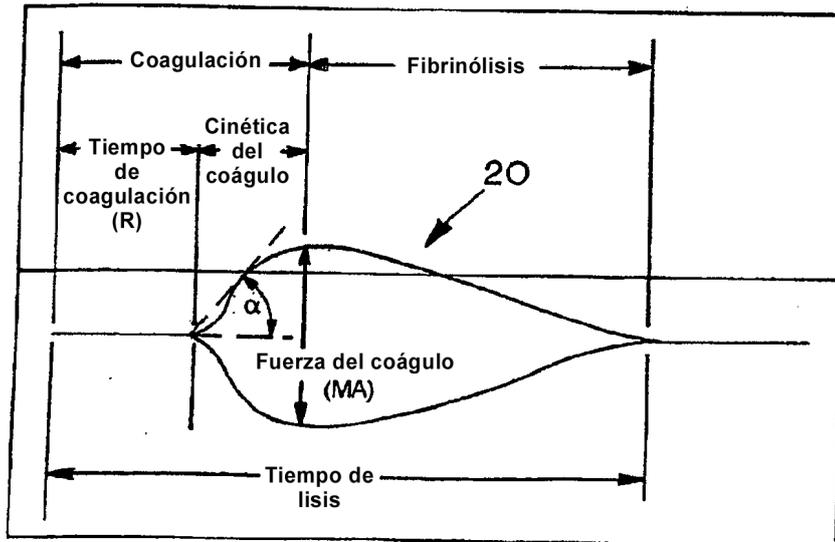


FIG.3

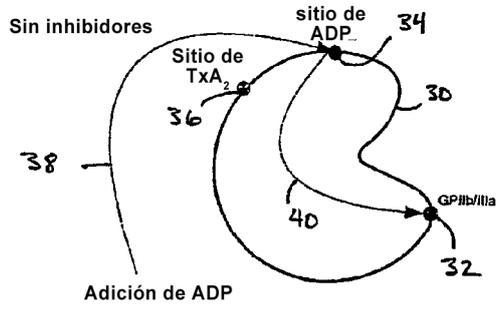


FIG. 4

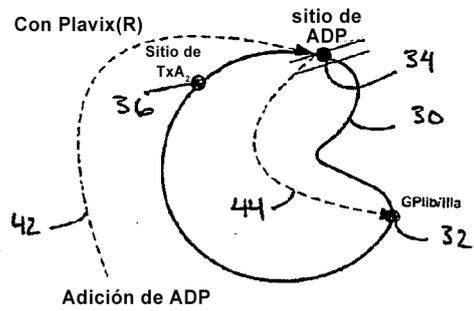


FIG. 5

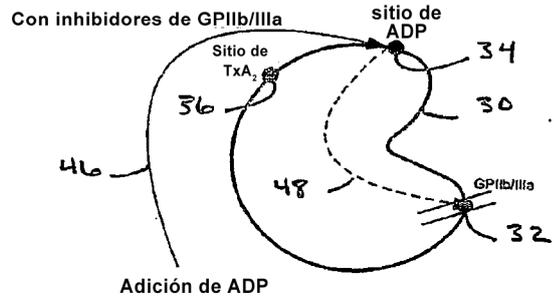


FIG. 6

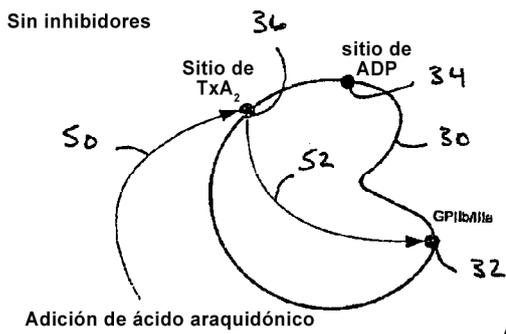


FIG. 7

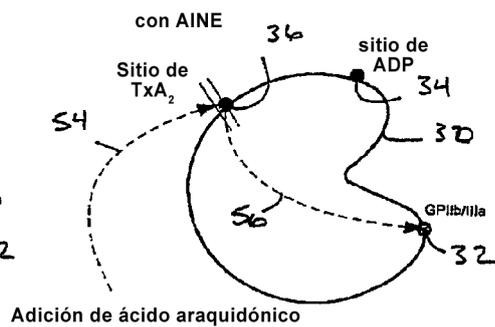


FIG. 8

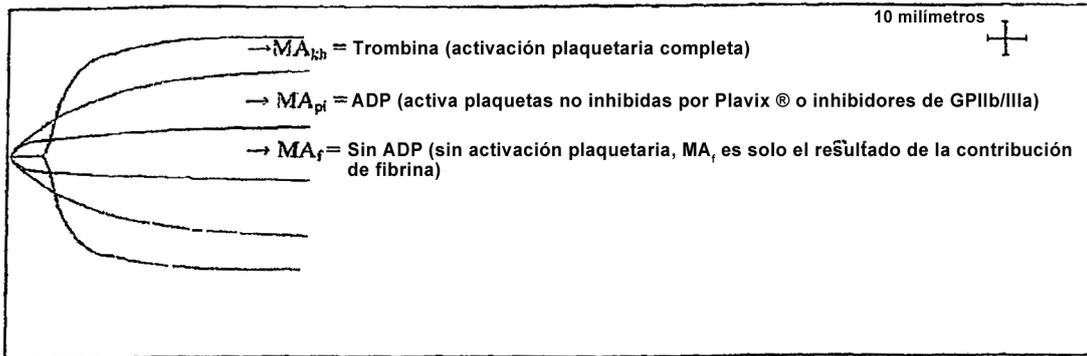
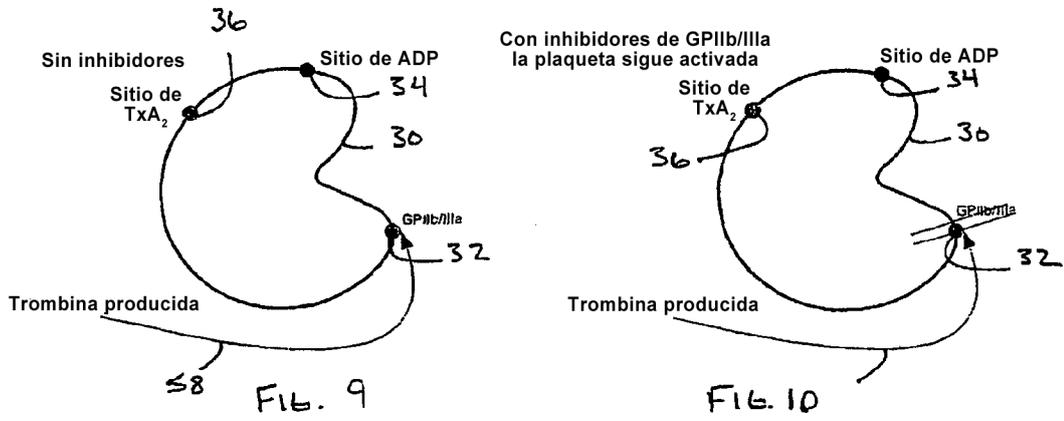


FIG. 11.

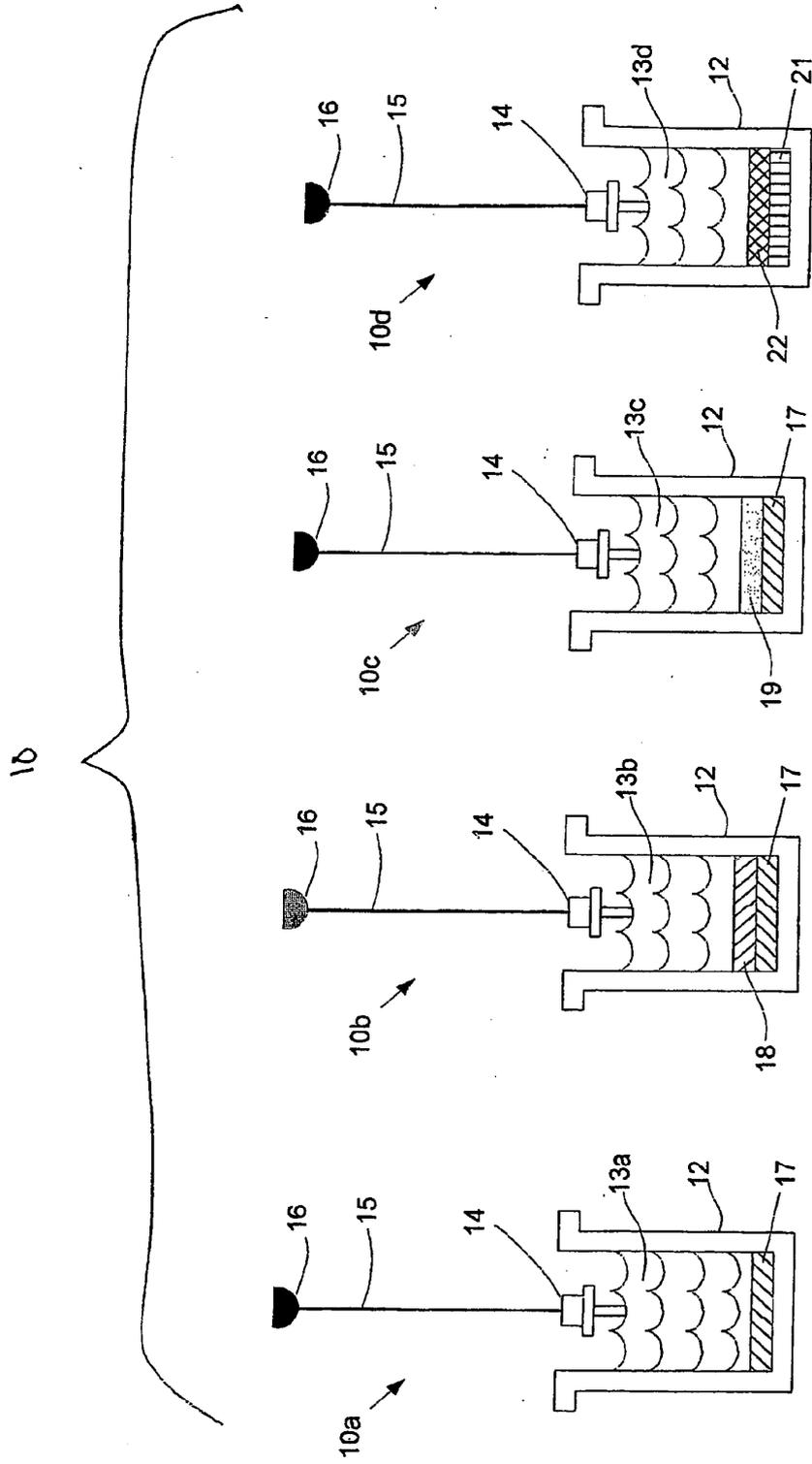


FIG. 12