

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 616**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/616 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2007 PCT/IT2007/000597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2008 WO08026234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2007 E 07827651 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2064556**

54 Título: **Procedimiento para la identificación y el tratamiento de sujetos resistentes al ácido acetilsalicílico**

30 Prioridad:

31.08.2006 IT RM20060406

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

28.09.2017

73 Titular/es:

PULCINELLI, FABIO MARIA (50.0%)

Via Livio Andronico 56

00136 Roma (RM), IT y

FRATI, LUIGI (50.0%)

72 Inventor/es:

PULCINELLI, FABIO MARIA;

FRATI, LUIGI y

MATTIELLO, TERESA

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 634 616 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 para la identificación y el tratamiento de sujetos resistentes al ácido acetilsalicílico

Campo de la invención

5 La presente invención versa sobre el uso de ácido acetilsalicílico en combinación con inhibidores de canal de MRP4 para el tratamiento de pacientes resistentes a dicho ácido acetilsalicílico. Esta invención también está relacionada con un procedimiento de análisis *in vitro* y su correspondiente equipo de reactivos para identificar a tales pacientes.

Técnica antecedente

10 Se viene estableciendo desde hace aproximadamente treinta años evidencia particular de laboratorio y clínica para una condición que se reveló de inmediato que era una marcada diferencia interindividual en la respuesta a la terapia con ácido acetilsalicílico (AAS) (en lo sucesivo, se usará el término AAS para denotar el ácido acetilsalicílico, sus derivados y sus correspondientes sales fisiológicamente aceptables) (Mason y otros, J. Am. Coll. Cardiol. 2005, 46, 986-93 y Hankey y Eikelboom The Lancet 2006, 367, 606-17), acompañada por una reducción progresiva en su eficacia en la terapia a largo plazo (Pulcinelli y otros, J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 43, 979-84). Esta evidencia ha sido definida como “resistencia al AAS”, y actualmente representa un problema, la extensión clínica real del cual aún está por demostrar y que sigue ocupando el tiempo y el interés de muchos investigadores.

15 La resistencia al AAS es identificada como la incapacidad de esta molécula para inhibir completamente la producción de tromboxano-A2 (TxA2) o la activación (resistencia bioquímica o de laboratorio) plaquetaria dependiente del TxA2. En consecuencia, esta resistencia puede ser responsable de que la terapia no logre prevenir episodios cardiovasculares en pacientes con tratamiento crónico con AAS (resistencia clínica) (Hankey y Eikelboom, ref. citada).

20 Los planteamientos adoptados para reducir este fenómeno son dos y están basados en dos tipos de intervención: aumentar las dosis diarias de aspirina o combinar la aspirina con otro fármaco con acción antiplaquetaria, pero ninguno de los dos planteamientos ha resultado eficaz; de hecho, en el primer caso, se ha demostrado que aumentar la dosis de aspirina (por encima de 150 mg/día) aumenta el riesgo de complicaciones cardiovasculares con respecto a los pacientes que toman 75-150 mg/día (ATC Br. Med. J. 2002, 324, 71-86); en el segundo caso, se ha establecido que, aunque este planteamiento terapéutico es útil en la prevención secundaria —es decir, después de un episodio cardiovascular— puede ser arriesgado en la prevención primaria, es decir, en pacientes con alto riesgo de complicaciones aterotrombóticas que previamente no han sufrido episodios cardiovasculares, porque puede aumentar el riesgo de hemorragia.

25 La aspirina®, cuyo ingrediente activo es el ácido acetilsalicílico (AAS), es el fármaco más vendido en el mundo entero; como analgésico, pertenece a la clase de los AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) y es el fármaco antiagregante por excelencia en el tratamiento de sujetos que han sufrido síndromes coronarios agudos o que tienen un riesgo elevado de episodios cerebro-cardiovasculares, o en el tratamiento de arteropatías ocliterantes de los vasos periféricos. Entre los numerosos estudios que indican la eficacia del AAS en la reducción de enfermedades aterotrombóticas, podemos citar un reciente metaanálisis realizado, en 287 ensayos aleatorizados, por la “Antiplatelet Trialists’ Collaboration” (Colaboración Antiplaquetaria de Investigadores Clínicos) (ATC Br. Med. J. 2002, 324, 71-86): este estudio ha demostrado que una ingesta diaria de AAS en pequeñas dosis (75-150 mg/día) reduce el riesgo de complicaciones cardiovasculares (infarto de miocardio, infarto cerebral y muerte vascular) en un 25% en pacientes que previamente han tenido enfermedad coronaria. El AAS está presente en más de treinta especialidades farmacéuticas, es preparado en formas diversas y puede ser administrado a través de diversas vías diferentes.

30 La importancia de este fármaco en la reducción de complicaciones aterotrombóticas deriva del hecho de que tales patologías presentan el episodio isquémico como consecuencia de la activación plaquetaria.

35 Las plaquetas son fragmentos celulares que se derivan de la fragmentación de los megacariocitos. La morfología de estas células parece ser compleja, presentando en sus extremos un glicocáliz que consiste en numerosas glicoproteínas de membrana. Más internamente, unos microtúbulos y microfilamentos componen el citoesqueleto, que tiene numerosos gránulos embebidos en el mismo, pertenecientes a tres grupos diferenciados: gránulos α , gránulos densos y gránulos λ . Los gránulos α , que están presentes en abundancia, contienen importantes proteínas para la coagulación y para la regeneración del tejido dañado. Los gránulos densos contienen mediadores químicos tales como ADP, ATP, serotonina y adrenalina, que arbitran la amplificación de la respuesta plaquetaria. Los gránulos λ son identificables como lisosomas. La escasa presencia de ARN da origen a una representación reducida del retículo endoplasmático rugoso; mientras que el retículo endoplasmático liso, denominado sistema tubular denso, está presente en abundancia y es responsable de la movilización del calcio intracelular.

40 Las plaquetas desempeñan el papel fisiológico de ser activadas tras una lesión vascular y de formar la primera etapa de contención de la ruptura vascular. En particular, tras el daño al endotelio, las plaquetas se adhieren rápidamente a las fibras de colágeno que acaban de quedar al descubierto, se activan y liberan mediadores químicos: ADP,

5 liberado por los gránulos densos, y tromboxano-A2 (TxA2), producido por la activación de la COX-1, que activan otras plaquetas en el sitio de la lesión, formando el agregado plaquetario que bloquea la hemorragia. Esta cascada de acontecimientos es por entero similar a la encontrada en episodio patológico de tal activación, que es la formación del trombo plaquetario; de hecho, en un vaso cuya luz se reduzca debido a la presencia de un ateroma en el subendotelio, eventos que son aún desconocidos producen la fisuración de la placa, con exposición de las fibras de colágeno y activación de las plaquetas, las cuales, al formar el agregado dentro del vaso, impiden el paso de hematíes corriente abajo de la lesión. Por lo tanto, esta interrupción del flujo sanguíneo será la causa de la patología isquémica, que puede ser transitoria o puede dar origen a la necrosis del tejido, llevando a episodios tales como angina o infarto de miocardio, si la lesión ocurre en la zona coronaria, TIA (accidente isquémico transitorio) o apoplejía, si la lesión ocurre en las arterias que suministran sangre al cerebro.

10 Por lo tanto, la secreción de los gránulos y la producción de tromboxano son dos episodios plaquetarios muy importantes para regular la formación del trombo plaquetario. Y por esta razón los dos fármacos principales hasta ahora usados para reducir episodios cardiovasculares tienen como objetivo la reducción de la activación plaquetaria por el ADP (tienopiridina) y la producción de tromboxano (AAS).

15 Esta eficacia del AAS en la reducción de la funcionalidad plaquetaria se basa en la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa de la prostaglandina sintasa H, enzima presente en las plaquetas y definida comúnmente como COX-1.

20 El mecanismo de acción del AAS consiste en la acetilación del aminoácido Ser 529 de la COX-1, que impide el acceso del sustrato, ácido araquidónico, al sitio catalítico. Por lo tanto, es cuestión de una inhibición enzimática irreversible.

25 El AAS es absorbido rápidamente en el estómago y en el intestino delgado después de su administración oral: el pico de su concentración en plasma se registra después de 30-40 minutos. La vida media es muy corta, llegando a solo 15-20 minutos. La inhibición plaquetaria, por otro lado, se manifiesta una hora después de la administración. La biodisponibilidad es del 40-50%, pero este parámetro no influye en su efecto sobre las plaquetas, dado que la COX-1 se acetila en la circulación presistémica.

30 Considerando que las plaquetas no tienen núcleo alguno, son incapaces de sintetizar enzima nueva; dado que el AAS inhibe irreversiblemente la función dependiente del tromboxano, y considerando que la vida media de las plaquetas es de 10 días, solo el 10% de las plaquetas presenta una COX-1 plenamente activa 24 horas después de la ingesta del fármaco, y por esta razón una ingesta diaria de AAS reduce la producción de tromboxano casi por entero.

En todo caso, sigue sin conocerse la actividad residual de la COX-1 plaquetaria tras el tratamiento con AAS. Presumiblemente, varía de un sujeto a otro.

35 La evidencia clínica y de laboratorio ha demostrado que no todos los pacientes que toman AAS se benefician de la terapia; por esta razón, se ha acuñado la expresión "resistencia al AAS". Un estudio reciente de los inventores (Pulcinelli y otros, J. Thromb. Haemost. 2005, 3, 2784-9) ha demostrado que, subyacente a este fenómeno en algunos pacientes con tratamiento crónico de AAS, puede estar la incapacidad de este fármaco para inhibir de manera eficaz la COX-1 plaquetaria, permitiendo la síntesis de bajas concentraciones de TxA2, aunque suficiente para inducir la activación plaquetaria.

40 A modo de confirmación de esta hipótesis, se puede citar un subestudio de HOPE en el que Eikelboom y otros, (Circulation 2002, 105, 1650-5) observaron una correlación positiva entre la concentración de 11-deshidro-tromboxano-B₂ en la orina de pacientes tratados con AAS y el riesgo relacionado de infarto. Además, Zimmerman y otros, (Circulation 2003, 108, 542-7) detectaron la presencia de una resistencia transitoria al AAS debido a la inhibición disminuida de la COX-1, en pacientes que habían sufrido una derivación coronaria, con riesgos de complicaciones cardiovasculares para estos pacientes. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se ha presentado una hipótesis de un protocolo de tratamiento capaz de reducir este fenómeno.

45 Los pacientes diabéticos también parecen ser menos sensibles a la acción del AAS, lo que está relacionado con una acción reducida sobre la COX-1; de hecho, un ensayo clínico (estudio PPP, Sacco y otros, Diabetes Care 2003, 26, 3264-72) ha demostrado que los pacientes diabéticos con un tratamiento crónico de AAS tienen más complicaciones cardiovasculares que los pacientes no diabéticos, y los propios responsables de la presente invención han demostrado recientemente que la producción de tromboxano plaquetario en diabéticos tratados con AAS es aproximadamente 5 veces mayor que la de pacientes no diabéticos (Pulcinelli y otros, J.A.C.C. 47(4) Suplemento A, 364A-365A).

55 Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) son una familia de siete glicoproteínas de membrana, MRP 1 a 7, que arbitran el transporte unidireccional de aniones orgánicos en las células. En las plaquetas, se ha demostrado que están presentes las MRP de tipo 4 y que tienen la función de transportar nucleótidos adenílicos a los gránulos densos; las MRP4, de hecho, pertenecen a la familia de proteínas de membrana denominada transportadores ABC (casete de unión a ATP) (Jedlitschky y otros, Blood 2004, 104, 3603-3610) y son responsables

del transporte unidireccional de aniones orgánicos del citosol bien hacia el exterior o bien hacia el interior de los gránulos densos.

El hecho de que los pacientes afectados por ciertas enfermedades, diabéticos o pacientes sometidos a operaciones quirúrgicas —por ejemplo, una derivación coronaria— presenten resistencia al AAS llevó a los presentes inventores a postular que la causa de la capacidad reducida de este fármaco para inhibir la función plaquetaria puede depender de la acumulación reducida del fármaco en la célula debido a que es transportada fuera del citosol a través de las MRP4 (las cuales actúan, por lo tanto, como “canales de paso”, de donde proviene el nombre de “canales de MRP4”) y que, en consecuencia, este fenómeno puede llevar a una reducción en su actividad farmacológica.

Se conoce el mecanismo por medio del cual funcionan los inhibidores de canal de MRP4 (WO 2005/044244) y el dipiridamol es mencionado entre los inhibidores.

El dipiridamol es usado normalmente en pacientes con insuficiencia coronaria acompañada o no por crisis de angina; coronaropatías; corazón senil y la profilaxis del infarto de miocardio; cardiopatías, como coadyuvante de la terapia digitálica; enfermedades en el ámbito cardiaco, cerebral y renal, debidas a la mayor agregabilidad plaquetaria, dado que está dotado de una pronunciada antiagregación plaquetaria y, por lo tanto, de actividad antitrombótica, atribuble a su actividad inhibidora de la fosfodiesterasa plaquetaria, que da origen a un aumento en AMPc. No hay sugerencia alguna en la bibliografía en el sentido de que el dipiridamol pueda aumentar la eficacia del AAS en la inhibición de la COX-1.

Las combinaciones de dipiridamol y AAS son conocidas y usadas en terapias relacionadas con enfermedades cardiovasculares. En particular, la patente estadounidense 4694024 describe un sistema consistente en la liberación en sucesión, en primer lugar, de dipiridamol y, a continuación, de ácido acetilsalicílico. La patente estadounidense 6015577, por otra parte, describe el uso combinado simultáneo de ácido acetilsalicílico y dipiridamol, usando menores dosis de ácido acetilsalicílico con respecto al documento 4694024 y establece la proporción ideal entre dipiridamol y AAS para reducir la formación de coágulos en ratones y postulando, por lo tanto, un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Ambas patentes se refieren a combinaciones de AAS y dipiridamol o fármacos similares y están dirigidas a determinar cuál es la mejor dosis de los dos ingredientes farmacológicos, cuál es la mejor proporción entre los dos ingredientes y cuáles son las mejores sales para producir un retardo en la absorción de ambos. Sin embargo, ninguna de las dos menciona ni sugiere el tratamiento de pacientes que resulten resistentes al AAS, ni que exista una resistencia causada por una disponibilidad reducida del AAS relacionada, o que puede estar relacionada, con la acción de las MRP4. Todo lo que se dice es que la combinación de AAS-dipiridamol es útil, porque ambos inhiben las plaquetas, sin mención alguna de las MRP4.

La farmacología, la farmacocinética, la eficacia y la seguridad de una combinación de dosis fijas de aspirina y dipiridamol de liberación prolongada (Aggrenox[®]ID) para la prevención secundaria de la apoplejía ya han sido reseñadas por Lenz T.L. y Hilleman D.E (Annals Pharmacotherapy (2000) 34: 1283-1290), mientras que el fenómeno de la resistencia a la aspirina con referencia a sus efectos en la apoplejía ha sido descrito por Sztrihá L.K. y otros, (J. Neurol. Sci. (2005) 229-230: 163-169) y por Uchiyama S. y otros, (Cerebrovasc. Dis. (2006) 21 (supl. 1): 7-16). Estas obras se centran en la prevención de la apoplejía y de la enfermedad aterotrombótica vascular y en la actividad antiplaquetaria del dipiridamol, sin mención alguna de la capacidad del dipiridamol de inhibir la proteína de transporte MRP4 y de un posible papel de esta en la resistencia a la aspirina.

Además, Serebruany y otros, (Cerebrovasc. Dis. (2006) 21: 98-105) describen la actividad antiplaquetaria de la administración combinada de dipiridamol y aspirina en pacientes con resistencia a la aspirina que han sufrido apoplejía, sin referencia alguna al transporte de MRP4 del AAS en plaquetas ni a la inhibición por parte del dipiridamol del transporte arbitrado por las MRP4. La resistencia a la aspirina también es estudiada en Méndez A. y otros, (Curriculum (consultable en línea) (2006) 6: 898-904, Schweiz Med. Forum). Reid y otros, (PNAS (2003) 100: 9244-9249) describen el papel de la proteína MRP4 en la liberación de prostaglandina de las células y emiten la hipótesis de que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos podrían ejercer su acción inhibiendo esta liberación de prostaglandina.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto ahora que el AAS es transportado por medio de los canales de MRP4; y también se ha descubierto experimentalmente que hay presente una expresión diferente de las MRP4 en pacientes sometidos a derivación coronaria, en diabéticos y en pacientes con un tratamiento crónico de AAS en comparación con voluntarios sanos.

Así, los inventores emiten la hipótesis de que cada célula, en presencia de dosis masivas de AAS, tales como las administradas a pacientes que se someten a cirugía de derivación coronaria, o en presencia de situaciones de enfermedad tales como la diabetes o en pacientes con alto riesgo de episodios trombóticos con tratamiento crónico con aspirina, procura reducir la concentración de sustancias orgánicas aniónicas en el citosol, exportando parte de ellas del citosol al exterior, y otra parte del citosol al interior de los gránulos. El AAS, que se encuentra a un pH

fisiológico, se presenta como un anión orgánico, asumiendo una carga neta negativa en su superficie, constituiría así una diana molecular para las MRP4.

Este fenómeno ha sido demostrado por los presentes inventores, que verificaron la implicación de los canales de MRP4 en la alteración del recorrido intracelular del AAS midiendo concentraciones citosólicas del AAS y de su metabolito, el ácido salicílico (AS) o concentraciones de estos dentro de los gránulos plaquetarios, en una combinación plaquetaria o en una preparación de gránulos plaquetarios, llevadas a cabo según el procedimiento documentado por Fukami MH y otros, (J. Cell. Biol. 1978, 77, 389-99), ambos tratados con AAS (50 μ M durante 10 minutos a 37°C o 4°C) o por medio del uso de AAS marcado con 14 C, empleando inhibidores específicos de MRP4, tales como dipiridamol y MK-571 (ácido (E)-3-[[[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil)etenil]fenil]-[[3-dimetilamino)-3-oxo-propil]-tio]metil]tio]-propanoico), y procedimientos selectivos de investigación tales como HPLC, para medir el AAS y el AS según el procedimiento descrito por Gaspari y Locatelli (Ther. Drug Monit. 1987, 9, 243-7) y un contador beta para medir la aspirina radiactiva.

Después, los presentes inventores descubrieron que inhibir el transporte arbitrado por las MRP4 es ventajoso en el tratamiento con AAS, porque reduce su extrusión del citosol, aumentando con ello su capacidad de inhibir la COX-1. Esta segunda hipótesis fue verificada evaluando el tromboxano-A2 (TxA2), marcador de la activación de la COX-1, liberado por las plaquetas con y sin aspirina, activadas con trombina.

Un objeto de la presente invención es el uso de ácido acetilsalicílico, sus derivados y sus correspondientes sales, y de inhibidores de MRP4, en combinación o en sucesión, para el tratamiento de la resistencia al AAS, según se ha definido anteriormente. Los preferidos entre los inhibidores de MRP4 son el dipiridamol y el MK-571.

Otro objeto de la invención está relacionado con las dosis diarias y el protocolo de administración, que pueden consistir ventajosamente en dosis diarias de aproximadamente 40 mg cada una de AAS y aproximadamente 75 mg de dipiridamol.

Otro objeto de la invención está relacionado con las cantidades relativas de AAS y dipiridamol, que pueden oscilar, respectivamente, entre 75 y 150 mg/día en el caso del AAS y entre 75 y 500 mg/día, preferentemente de 75 a 200 mg/día, en el caso del dipiridamol.

Otro objeto de la invención está relacionado con el procedimiento y el uso de un equipo de reactivos para la detección de pacientes resistentes al AAS, incluyendo las resistencias que se originan de polimorfismos genéticos.

La invención está definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de las Figuras

Las Figuras 1 y 2 presentan los resultados obtenidos, que son representativos de la eliminación del AAS de las plaquetas por medio de las MRP4, logrados midiendo las concentraciones del AAS y de su metabolito, el ácido salicílico, en el citosol (Fig. 1) y en los gránulos plaquetarios (Fig. 2) que habían sido incubados con aspirina después de diferentes tratamientos, tales como inhibidores del transporte arbitrado por las MRP4 (dipiridamol y MK-571), o sistemas que redujeron el transporte activo de tales canales (incubación a 4°C o con antioxidantes de ATP) y registrando el porcentaje obtenido en comparación con plaquetas o gránulos tratados con AAS solo.

La Figura 3 ilustra la liberación de AAS marcado con 14 C después de la activación de plaquetas radiomarcadas con trombina.

La Figura 4 ilustra la expresión de MRP4 en un lisato proteínico plaquetario de voluntarios sanos en comparación con pacientes que se habían sometido a cirugía de derivación coronaria, 5 días después de la operación.

La Figura 5 ilustra experimentos realizados usando la técnica de inmuno-oro, que revela la ubicación del canal por medio de microscopía electrónica; los pacientes resistentes presentan una mayor concentración de células en el canal (panel B), en comparación con voluntarios sanos (panel A).

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, una combinación de ácido acetilsalicílico, sus derivados y sales fisiológicamente aceptables, e inhibidores de canal de MRP4, formulable en coadministración, es usada para el tratamiento de pacientes resistentes al AAS, según se ha definido anteriormente.

El medicamento según la presente invención puede ser obtenido mezclando los ingredientes activos o sus correspondientes derivados y sales farmacéuticamente aceptables con excipientes adecuados para las composiciones para su administración oral o parenteral, o para su administración intramuscular, venosa, bucal o nasal. Todos los excipientes, diluyentes, vehículos y/o adyuvantes necesarios para la preparación son aquellos con los que estará familiarizado el experto en la técnica.

Más específicamente, con el término “composición” se quiere decir una combinación de ingredientes activos que es capaz de producir un efecto farmacológico, según se ha indicado anteriormente. La “composición” incluye —además de los ingredientes activos— excipientes, diluyentes vehículo y/o adyuvantes que, por sí solos, no son capaces de producir un efecto farmacológico en el sujeto que recibe la composición. Estos excipientes, diluyentes, vehículos y adyuvantes son muy conocidos para los expertos en la técnica, y pueden ser seleccionados de entre el grupo de sustancias tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, emulsionantes, sustancias tampón, conservantes y similares.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas que pueden comprender la combinación de ingredientes activos según la invención son las que se encuentran en forma sólida, semisólida o líquida, en forma de grageas, cápsulas, píldoras, comprimidos, pastillas, granulados, jarabes, ampollas, gotas, soluciones, suspensiones, emulsiones, en dosificaciones unitarias o separadas, jarabes listos para su uso o unidades *ex tempore*, cremas y geles. Otros ejemplos de formulaciones son las de uso parenteral, formas inyectables para administración intramuscular, subcutánea, transdérmica o intravenosa.

Las composiciones pueden ser administrados por la boca o parenteralmente, rectal o cutáneamente.

La coadministración significa un envase que contiene formas de administración unitarias o separadas de los ingredientes activos, acompañadas por las instrucciones para la administración simultánea coordinada o la administración en sucesión de los ingredientes activos según la dosificación recetada por el médico.

El médico decide las dosis, las posologías y los protocolos de administración en función de su experiencia, de la gravedad de la enfermedad y del estado general y la edad del paciente.

Los pacientes que manifiestan resistencia al AAS según la presente invención presentan expresión plaquetaria de la MRP4 mayor que los controles sanos (Fig. 4).

En la reivindicación 1 se reivindica un procedimiento diagnóstico para la detección de sujetos resistente al AAS *in vitro*. Una manera de llevar a cabo el procedimiento comprende las etapas siguientes:

a. tomar una muestra de un fluido biológico de un paciente, generalmente sangre venosa periférica purificada, de la cual se obtiene un lisato proteínico plaquetario, el cual, después de su purificación, es decir, mediante electroforesis, es puesto en contacto con anticuerpos mono o policlonales anti MRP4 (disponibles en el mercado) en condiciones y durante un tiempo suficientes para la formación de un complejo entre el antígeno (MRP4) y el anticuerpo;

b. cuantificar la presencia de la banda característica de las MRP4, pudiendo hacerse la identificación mediante transferencia de Western haciendo una comparación con un estándar de control compuesto de la proteína MRP4.

La técnica de la transferencia de Western es muy conocida para el experto en la técnica, el cual, en función de la presente descripción y de su conocimiento, puede identificar fácilmente las condiciones óptimas de implementación del procedimiento.

Los expertos en la técnica están familiarizados con las definiciones de “anticuerpo policlonal” y “anticuerpo monoclonal”.

Otro modo de identificación se basa en el estudio del ARN mensajero plaquetario responsable de la síntesis de esta proteína (MRP4), que es mayor en sujetos resistentes que en sujetos sanos. En este caso, la determinación puede hacerse usando la técnica de la transferencia de Southern o PCR en tiempo real (RT-PCR), siendo ambas muy conocidas para el experto en la técnica, que identificará fácilmente las necesarias enzimas de restricción y las subsiguientes condiciones para la electroforesis.

Un equipo de reactivos de detección divulgado puede contener con ventaja, además del material para llevar a cabo el ensayo (tubos de ensayo de evaluación, pocillos de placa de titulación, reactivos, etc.) y de las explicaciones relativas al procedimiento de uso, anticuerpos anti-MRP4 para un ensayo de evaluación por medio de una transferencia de Western; o enzimas de restricción específicas para las MRP4 (particularmente provechoso para el equipo de reactivos TaqMan Gene Expression Assay) que han de ser analizadas cuantitativamente para determinar el ARNm plaquetario por transferencia de Southern o PCR en tiempo real.

Además, el equipo de reactivos puede comprender adecuadamente:

– un sistema para la purificación de plaquetas procedentes de los otros componentes sanguíneos granulares (Platelet GelSep, de BioCytex, para purificaciones llevadas a cabo con procedimientos de centrifugación en gel); y

– reactivos capaces de cuantificar las interferencias debidas a componentes no plaquetarias en la preparación celular que ha de usarse en el diagnóstico, tales como anticuerpos monoclonales o enzimas de restricción anti CD45 que revelen la presencia de leucocitos.

En cuanto a la evaluación de los resultados que pueden obtenerse con el procedimiento de las enzimas de restricción, se puede emitir la hipótesis de que los valores superiores a 20 UA (unidades arbitrarias), preferentemente superiores a 25 UA, más preferentemente superiores a 30 UA, y aún más preferentemente superiores a 35 UA de ciclos umbral de MRP4/GAPDH son valores que identifican a los pacientes resistentes.

5 Considerando las variabilidades preanalíticas y analíticas de los datos de laboratorio obtenidos con el equipo de reactivos para el ARNm, se recomienda crear los propios valores normales de cada cual, que pueden obtenerse tras analizar al menos 15 voluntarios sanos. En cuanto al equipo de reactivos con transferencia de Western, se sugiere la adquisición de datos de pacientes resistentes junto con los de voluntarios sanos. Así, es mejor añadir al equipo de reactivos una preparación estándar de MRP4 con un valor conocido, y el paciente será considerado positivo con una densitometría proteica superior al 10%, preferentemente al 20%, mejor al 35% y mucho mejor al 50% en comparación con el estándar.

10 Por medio del procedimiento de análisis de la invención y del correspondiente equipo de reactivos, es posible identificar y monitorizar a los sujetos cuyas plaquetas muestran niveles elevados de MRP4, siendo esto de importancia fundamental para reducir el grado de fracasos terapéuticos ligados al tratamiento crónico con aspirina. Ventajosamente, el equipo de reactivos permite identificar tanto a pacientes resistentes al AAS como a sujetos que presentan tal resistencia debido a causas genéticas.

15 Con base en las hipótesis presentadas, los presentes inventores han demostrado experimentalmente que puede transmitirse AAS a través de canales de MRP4 y que, en pacientes con expresión plaquetaria aumentada de esta proteína, hay presente una menor capacidad del AAS para reducir la funcionalidad plaquetaria y, en consecuencia, la inhibición del transporte arbitrado por las MRP4 aumenta la capacidad terapéutica inducida por el AAS.

El hecho de que el AAS pueda ser transportado al interior de los gránulos densos o extrudido de la célula por medio de las MRP4 se demuestra mediante los siguientes resultados experimentales:

1) la inhibición de transporte arbitrado por las MRP4 aumenta la capacidad de las plaquetas de retener el AAS en el citosol; de hecho, si las plaquetas son tratadas de antemano con dipiridamol o MK-571 10 minutos antes de la incubación de las plaquetas con AAS 50 microM, las concentraciones citosólicas de ácido acetilsalicílico (AAS) o de su metabolito, el ácido salicílico, son 285% y 293% mayores, respectivamente, en las plaquetas pretratadas con dipiridamol 100 microM, mientras que son del 208% y el 202%, respectivamente, en las plaquetas tratadas con MK-571 en comparación con las plaquetas tratadas con el disolvente solo tanto de dipiridamol como de MK-571 (DMSO, dimetilsulfóxido) (véase la Figura 1). El dipiridamol, además de inhibir el transporte arbitrado por estos canales, también es un inhibidor de la actividad plaquetaria, porque aumenta las concentraciones plaquetarias de AMPc, inhibiendo la isoforma V de la fosfodiesterasa (PDE tipo V). Los inventores han demostrado que la acción de dipiridamol en la inhibición de transporte arbitrado por las MRP4 no ocurre a través de la inhibición de la PDE de tipo V, porque otro inhibidor de esta enzima, 1-(3-clorofenilamino)-4-fenilftalazina (MY-5445), de fórmula molecular $C_{20}H_{14}ClN_3$, no aumenta las concentraciones citosólicas de AAS o salicilato (110% y 120%, respectivamente) (véase la Figura 1);

2) el tratamiento de las plaquetas con AAS a una temperatura por debajo de la temperatura corporal (4°C) aumenta las concentraciones citosólicas de AAS y salicilato en las plaquetas en un 240% y un 160%, respectivamente: esto demuestra que el transporte del AAS arbitrado por las MRP4 es eficiente a la temperatura corporal (aproximadamente 37°C) (véase la Figura 1);

3) el AAS es internalizado dentro de los gránulos plaquetarios por medio de las MRP4; este efecto fue demostrado evaluando el AAS en los gránulos después de que estos orgánulos hubieran sido tratados con AAS; que el transporte también puede producirse a través de las MRP4 se demuestra por el hecho de que es necesario que el transporte ocurra a 37°C y en presencia de ATP en el medio externo, porque el transporte arbitrado por las MRP4 es un transporte activo. De hecho, la máxima concentración alcanzada fue obtenida si se añadía ATP al medio externo y la incubación con AAS se hacía a 37°C, mientras que se reducía sustancialmente si la incubación del AAS se hacía a 4°C (53,6%) en presencia de apirasa (56,1%), una enzima que degrada el ATP, o si las plaquetas eran tratadas de antemano con dipiridamol (41,7%) 10 minutos antes de la adición del AAS (véase la Figura 2);

4) las plaquetas liberan AAS después de su activación con trombina, y esta liberación no se da si se lleva a cabo un tratamiento previo con dipiridamol. Al incubar las plaquetas con AAS radiomarcado, los inventores pudieron verificar que, si esta preparación plaquetaria era activada con trombina, era posible evaluar la sustancia radiomarcada en el medio externo; este efecto se debe al hecho de que, después de su activación, las plaquetas liberan el contenido de los gránulos, tal como ADP, ATP, Ca^{2+} , etc., al exterior de las células. La demostración de que el AAS entra en los gránulos la proporciona el hecho de que, en caso de tratamiento previo de las plaquetas con dipiridamol, no se produjo la liberación de AAS radiomarcado, mientras que la liberación de los otros componentes granulares fue completamente normal ($1,8 \pm 0,3$ nmoles de ATP liberados por las plaquetas pretratadas con dipiridamol en contraposición con $1,9 \pm 0,1$ nmoles de ATP liberados por las plaquetas de control) (véase la Figura 3);

5) en plaquetas provenientes de megacariocitos en cultivo en los que se suprimió la expresión del canal bloqueando la transcripción de ARN por medio de un ARNi específico para MRP4, las plaquetas tratadas con AAS presentaron valores de AAS y salicilato intracelulares que eran 159% y 144% mayores, respectivamente, que los de

una población plaquetaria que era similar, pero tratada únicamente con el vehículo (lipofectamina) e incubada con la misma concentración y durante el mismo tiempo con AAS.

Otra importante conclusión a la que llegaron los inventores a través de los experimentos realizados es que, reduciendo el transporte arbitrado por las MRP4, se demuestra posible potenciar la acción del AAS en la inhibición de la COX-1. De hecho, cuando se añade dipiridamol o MK-571 antes del tratamiento con AAS, la producción de tromboxano, una prostaglandina producida por plaquetas como consecuencia de la activación de la COX-1, inducida por la trombina, es menor que la de las plaquetas que están tratadas con aspirina pero no tratadas previamente con inhibidores del transporte arbitrado por las MRP4. La producción de tromboxano —inducida por la trombina— de las plaquetas tratadas con aspirina fue de 343,7 ng/10⁸ células, mientras que, si se inhibía el transporte arbitrado por las MRP4 mediante dipiridamol o MK-571, la producción de tromboxano bajaba a 142,7 ng/10⁸ células —una reducción del 58%—, y a 140,22 ng/10⁸ células —una reducción del 59,2%—, respectivamente.

El hallazgo de que las plaquetas provenientes de megacariocitos en cultivo, en los que se había suprimido la expresión del canal mediante tratamiento con ARNip, si eran tratadas con aspirina, presentaban una producción de tromboxano reducida en un 51% en comparación con plaquetas provenientes de megacariocitos en cultivo tratados con el vehículo de ARNip solo, demuestra claramente que, si las plaquetas no presentan este canal, la aspirina inhibe la COX-1 con mayor efectividad.

La correlación entre la resistencia al AAS y la MRP4 también resulta evidente del hecho de que los pacientes que parecen ser más resistentes a la acción del AAS, tales como, por ejemplo, los sometidos a una cirugía de derivación coronaria, los diabéticos y los pacientes con tratamiento crónico con AAS, tienen una expresión de MRP4 plaquetaria diferente que la de voluntarios sanos (Fig. 4). De hecho, en todos los pacientes sometidos a ensayo, se observa una banda relacionada con la MRP4 (Jedlitschky y otros, Blood 2004, 104, 3603-3610) que es densitométricamente mayor que la de controles sanos.

Se puede emitir la hipótesis de que en las plaquetas de pacientes resistentes hay mayor expresión del canal. Esta hipótesis se confirma mediante experimentos realizados usando la técnica de inmuno-oro (Figuras 5A y 5B), en los que los inventores vieron que los pacientes resistentes presentan una mayor concentración plaquetaria del canal que voluntarios sanos. Como confirmación adicional del hecho de que los pacientes que son menos sensibles a la acción de la aspirina en la reducción de la respuesta plaquetaria, los inventores han verificado que, en ellos, la expresión génica plaquetaria de la MRP4, calculada cuantificando el ARNm específico, aumenta en un 214% en plaquetas provenientes de pacientes sometidos a derivación coronaria en comparación con plaquetas de voluntarios sanos.

Por último, los presentes inventores han demostrado que, reduciendo el transporte arbitrado por la MRP4 en plaquetas obtenidas de pacientes muy resistentes al AAS, se obtiene un aumento en la eficacia terapéutica de la aspirina.

De hecho, en plaquetas obtenidas de pacientes sometidos a una derivación aortocoronaria y tratadas de antemano *in vitro* con dipiridamol antes que con aspirina, la producción de tromboxano inducida por trombina fue del 35% con respecto a las plaquetas tratadas con aspirina sola (499,8 ± 247,7 ng/10⁸ células en contraposición con 1437,0 ± 549,1 ng/10⁸ células).

Para evaluar los valores plaquetarios de MRP4-ARNm capaces de identificar a los pacientes resistentes a la aspirina, se realizaron dosificaciones en voluntarios sanos y pacientes a 5 días de una operación de derivación coronaria y los inventores verificaron que los voluntarios sanos presentaban valores de 21,1 ± 12,8 EM, 3,2 de media, 23,2 de mínima, 4,1 de máxima, 37,5 UA de ciclos umbral de MRP4/GAPDH. Puede emitirse la hipótesis de que los valores superiores a 20 UA, preferentemente superiores a 25 UA, preferentemente superiores a 30 UA, mucho más preferentemente superiores a 35 UA, son valores que identifican a los pacientes resistentes. Considerando las variabilidades preanalíticas y analíticas de los datos de laboratorio obtenidos con el equipo de reactivos para el ARNm, se recomienda crear los propios valores normales de cada cual, que pueden obtenerse tras analizar al menos 15 voluntarios sanos. En cuanto al equipo de reactivos con transferencia de Western, los datos de los inventores demostraron que los pacientes resistentes presentaron una expresión de proteínas superior al 20% (densitometría llevada a cabo con el programa informático ImageJ, NIH, Bethesda, EE. UU.) en comparación con controles de voluntarios sanos y pacientes estudiados al mismo tiempo.

Se puede emitir la hipótesis de que la mayor expresión de estos canales reduce los efectos farmacológicos de la aspirina en las plaquetas, porque reduce su captura intracelular.

Por esta razón, la identificación de los pacientes cuyas plaquetas presenten niveles elevados de MRP4 es de importancia fundamental para reducir el grado de fracasos terapéuticos ligados al tratamiento crónico con aspirina.

La conclusión final es que el AAS puede ser eliminado de las plaquetas por medio del transporte arbitrado por las MRP4: por lo tanto, una mayor expresión de estos canales sería responsable de la acumulación celular reducida del fármaco, con una consiguiente reducción del efecto farmacológico. Una lista ilustrativa, pero en modo alguno exhaustiva de las MRP4, incluye, además del dipiridamol [2,6-bis-(dietanolamino)-4,8-dipiperidino-(5,4-d)-pirimidina]

5 y el mopidamol [2,6-bis-(dietanolamino)-8-piperidino-(5,4-d)-pirimidina]: MK-571; derivados de la pirimido-pirimidina tales como los descritos en la patente estadounidense 4694024; análogos de la purina tales como las 6-oxo-purinas y las pirazol[3,4-d]pirimidinas (descritas en J. Comb. Chem 2007, 9, 210-218); derivados de la quinolina, tales como mefloquina, amodiaquina, cloroquina, primaquina, quinidina y quinina, cilostazol y derivados de la quinolinona, polifenoles, en particular los de origen natural y los de origen sintético, tales como los descritos en FEBS J. Septiembre de 2005, 272 (18): 4725-4740; diclofenaco, celecoxib, dl-butionina-(S,R)-sulfoximina (BSO), probenecid, S-(2,4-dinitrofenil)-glutati6n (DNP-SG), N-acetil-(2,4-dinitrofenil)cisteina (NAc-DNP-Cys), α -naftil- β -D-glucur6nido, p-nitrofenil- β -D-glucur6nido, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, ketoprofeno, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, disulfiram; derivados and sales fisiol6gicamente aceptables correspondientes de dichos compuestos, y mezclas de los mismos.

10 Todos ejercen la acci6n de reducir el transporte arbitrado por las MRP4, mejorando as6 el efecto inhibidor del AAS en la COX-1 plaquetaria.

La concentraci6n de dipiridamol necesaria en estudios *in vitro* es alta, pero podr6a ser menor *in vivo* y oscilar entre 75 y 500 mg, preferentemente entre 75 y 200 mg.

15 Este nuevo mecanismo de acci6n del dipiridamol o de otros inhibidores del transporte arbitrado por las MRP4 puede ofrecer diversas ventajas, tales como reducir el efecto denominado resistencia al AAS, mejorando as6 la eficacia terap6utica de este f6rmaco en las enfermedades descritas anteriormente; tambi6n puede ofrecer la importante ventaja de poder reducir las dosis farmacol6gicamente activas en todas las enfermedades que requieren tratamiento cr6nico, reduciendo as6 las complicaciones del tratamiento con AAS y, sobre todo, su gastrolesividad.

20 Las mol6culas de nueva generaci6n que ser6n capaces de reducir el transporte arbitrado por las MRP4, adem6s de reducir el fen6meno de la resistencia a agentes de quimioterapia y a agentes antivirales en enfermedades oncol6gicas, tambi6n ofrecer6n la ventaja, como han demostrado los inventores, de mejorar el tratamiento cr6nico con aspirina en todas las enfermedades que requieren tal tratamiento.

25 Las ventajas que se derivan del uso combinado del tratamiento con AAS m6s inhibidores del transporte arbitrado por las MRP4 son las siguientes:

1) reducci6n de complicaciones en enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, arteropat6as obliterantes de los vasos perif6ricos, retinopat6a, fibrilaci6n auricular, trombosis venosa profunda, enfermedades del ritmo cardiaco, trombocitosis, gestosis del embarazo, abortos recurrentes y tratamiento con AAS de pacientes con un historial familiar de diversos tipos de tumores, tales como c6ncer de colon, para reducir la incidencia de estas enfermedades;

2) reducci6n de los accidentes cardio y cerebrovasculares (fracaso terap6utico) en pacientes en tratamiento con AAS solo en prevenci6n primaria (pacientes con alto riesgo de enfermedades aterotromb6ticas); en prevenci6n secundaria (pacientes que han padecido previamente un episodio tromb6tico);

3) reducci6n de la dosis diaria de AAS, con una reducci6n de los efectos secundarios;

4) posibilidad de administrar AAS a pacientes que no pueden tomar grandes cantidades de 6l, debido a su sensibilidad g6strica al f6rmaco, pero que necesitan tratamiento durante periodos prolongados, tales como pacientes afectados por enfermedades inflamatorias cr6nicas;

5) posibilidad de administrar AAS a una dosis reducida durante cortos periodos y de reducir as6 el riesgo de una lesi6n g6strica inducida por los AINE.

45 Se presentan los siguientes ejemplos para ilustrar la invenci6n, pero no debe considerarse que sean limitantes de su alcance.

Selecci6n de los pacientes

Se inscribi6 en el estudio a los siguientes pacientes:

50 – voluntarios sanos que hab6an declarado que no hab6an tomado ning6n f6rmaco en los 15 d6as anteriores a los an6lisis sangu6neos;

– pacientes bajo terapia cr6nica de aspirina (100-160 mg/d6a durante al menos dos meses);

55 – pacientes que padec6an diabetes mellitus de tipo II que hab6an sido diagnosticados seg6n las directrices de la Sociedad Internacional de Diabetes (Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2006;29 Supl 1:543-8);

– pacientes a los 5 d6as de una derivaci6n a6rtica-coronaria.

Criterios de exclusión

Los siguientes pacientes fueron excluidos de la investigación:

- 1) los que habían tomado, en los últimos 15 días, fármacos que interferían en la función plaquetaria (fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, tienopiridinas, anticoagulantes);
- 2) los que padecían patologías que podían alterar la funcionalidad plaquetaria;
- 3) los que presentaban un número de leucocitos en el PRP superior a $0,2 \times 10^3$ células/microlitro.

Preparación de las muestras biológicas: plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP)

Se tomó sangre venosa de los pacientes en un tubo de ensayo con un 3,8% de citrato sódico (disolución 1:10).

La muestra de sangre con citrato sódico fue centrifugada a 200 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, obteniendo así como sobrenadante plasma rico en plaquetas (PRP). A continuación, el PRP fue centrifugado a 200 g durante 5 minutos para mejorar la purificación de la sangre total del sobrenadante.

Acto seguido, el PRP fue sometido a un recuento de plaquetas mediante un contador de células sanguíneas Celltac Auto Nihon Kohden (MEK 8118K). A continuación, las plaquetas fueron retiradas del plasma mediante centrifugación del PRP, acidificadas hasta un pH de 6,5 con ACD (ácido cítrico, citrato sódico y glucosa 1/10 v/v), a 800 x g durante 10 min. y resuspendidas en tampón de Tyrode (CaCl₂ 0,20 g/L, KCl 0,20 g/L, MgCl₂ g/L, MgCl₂ g/L, NaCl 8,00 g/L, NaH₂PO₄·H₂O), a pH 7,35 y cargadas con glucosa y albúmina. La preparación de una suspensión granular densa rica en plaquetas se realizó según el procedimiento documentado por Fukami MH y otros, (J. Cell. Biol. 1978, 77, 389-99) y el grado de pureza fue verificado mediante sonda fluorimétrica de mepacrina y el porcentaje de pureza fue comprobado con el citofluorímetro. Si la concentración de los gránulos densos en comparación con los otros orgánulos era inferior al 80%, la suspensión de gránulos plaquetarios no se usaba para el estudio.

Tratamiento de plaquetas con aspirina

Las plaquetas resuspendidas en el tampón de Tyrode a la concentración de $2,5 \times 10^8$ células/ml fueron tratadas con aspirina (50 microM) a 10°C durante 15 min y luego mantenidas a 37°C o a 4°C durante 15 min.

Reducción del transporte arbitrado por las MRP4

Se usaron inhibidores de MRP4 tales como dipiridamol y MK571 (ácido (E)-3-[[[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil) etenil]fenil]-[[3-dimetilamino)-3-oxo-propil]-tio]-metil]tio]-propanoico), ambos a 100 microM e incubados 30 min a TA antes de la adición de aspirina.

En la suspensión granular densa rica en plaquetas, se añadieron ATP y AAS a la preparación, luego se la mantuvo a 37°C durante 15 min para reducir el transporte arbitrado por MRP4; la suspensión fue pretratada ya fuera con apirasa, sustancia antioxidante de ATP, o con dipiridamol 30 min antes de añadir aspirina, o el tratamiento con aspirina se realizó a 4°C.

Medición de las concentraciones citosólicas de AAS y de su metabolito, el ácido salicílico (AS)

La captura de aspirina dentro de las plaquetas o en los gránulos densos fue medida mediante el procedimiento de Gaspari y Locatelli (Ther. Drug Monit. 1987, 9, 243-7).

Secreción plaquetaria de AAS marcado con ¹⁴C, en plaquetas activadas con trombina

Se añadió aspirina marcada con ¹⁴C (American Radiolabeled Chemicals, Inc. San Luis, EE. UU.) a la suspensión plaquetaria durante 15 min a 37°C. Después de quitar, por doble centrifugación, el exceso de la sustancia marcada, las plaquetas fueron activadas con trombina (0,2 U/ml) y luego centrifugadas. La reducción del transporte arbitrado por las MRP4 se realizó mediante la preincubación de la preparación plaquetaria con dipiridamol 30 min antes de la adición de aspirina. Los resultados se documentan evaluando el porcentaje de la radiactividad presente en el sobrenadante en comparación con la radiactividad total de la preparación plaquetaria. La secreción de ATP fue analizada como control mediante el procedimiento luminométrico con un equipo comercial de reactivos (Chronolog, Havertown, Pensilvania, EE. UU.).

Evaluación de la eficacia biológica de la aspirina

La evaluación de la eficacia biológica de la aspirina en las plaquetas se efectuó estudiando la producción de Tromboxano A2, marcador específico de la red de la ciclooxigenasa en las plaquetas. Las plaquetas tratadas con aspirina y/o dipiridamol (véase anteriormente) fueron activadas con trombina 1U/ml durante 1 h a 37°C, y luego centrifugadas 1 min a 8.000 g. Se midió el tromboxano B2, metabolito estable del TXA₂, en el sobrenadante mediante un equipo comercial de reactivos para ELISA (Cayman Chemicals Co.).

Evaluación de la expresión plaquetaria de MRP4 mediante transferencia de Western

La expresión plaquetaria de the MRP4 fue estudiada a través de una técnica electroforética, y la subsiguiente transferencia de proteína en la membrana mediante transferencia de Western, a partir de un volumen de plasma rico en plaquetas (PRP) que contenía 5×10^8 plaquetas.

- 5 Después de quitar cuidadosamente el sobrenadante, se realizaron dos lavados de las plaquetas mediante su suspensión en tampón de Tyrode (pH 6,35) y centrifugación a 8000 g durante 2 min.

La bolita de plaquetas fue resuspendida en 200 μ l de tampón de lisis (tampón RIPA) y mantenida en hielo durante una hora.

- 10 A continuación, se añadieron la solución 5x de tampón de Laemmli y betamercaptoetanol al 5%, y la muestra se mantuvo a 100°C durante 5 min. Después de 15 min en hielo, la muestra fue centrifugada a 12000 g durante 4 min y el sobrenadante fue usado acto seguido para la electroforesis sobre un gel de poliacrilamida al 4-12% que contenía SDS al 1% (SDS-PAGE). Para identificar las dimensiones de las proteínas se usó un marcador que contenía una mezcla de proteínas coloreadas con peso molecular conocido.

A continuación, las proteínas fueron transferidas en la transferencia de Western sobre una membrana de celulosa.

- 15 La identificación de la proteína se realizó mediante anticuerpos policlonales primarios dirigidos contra la MRP4 (Santa Cruz y Alexis), y anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa y tratados luego con ECL (una solución que contiene un sustrato quimioluminiscente), para la producción de luz que pueda detectarse con película fotográfica.

Evaluación de la expresión plaquetaria de MRP4 mediante micrografía de inmuno-oro

- 20 Las plaquetas fueron fijadas con paraformaldehído (2%) y embebidas en gelatina al 10% y solidificadas en hielo. Después, la preparación fue congelada en nitrógeno líquido y crioseccionada usando un ultramicrotomo Ultracut EM FC (Leica). Se trataron así criosecciones ultradelgadas con el anticuerpo policlonal anti MRP4 (Alexis), seguido por la adición de conjugados de proteína A-oro coloidal de 10 nm de diámetro. Después de marcar todas las criosecciones ultradelgadas, las preparaciones fueron fijadas en glutaraldehído al 1% y tincionadas con una solución de metilcelulosa (2%) y acetato de uranilo (0,4%) para observarlas bajo microscopía electrónica.

- 25 Preparación plaquetaria a partir de megacariocitos en cultivo tratado con ARNmip

Se prepararon plaquetas a partir de megacariocitos en cultivo según el procedimiento de Guerriero y otros, (Journal of Cell Science 119, 744-752, 2006). La transfección con ARNip se realizó según el procedimiento de Dharmoon Research usando el producto SMARTpool de cuatro ARNip para las MRP4. Tres días después de la transfección, se aislaron mediante centrifugación las plaquetas producidas a partir de megacariocitos, luego fueron tratadas con aspirina y, después, se midieron la captura de la aspirina y su eficacia farmacológica (véase lo anterior). Se utilizaron como control plaquetas provenientes de megacariocitos tratados solo con el vehículo usado para la transfección de ARNip.

- 30 Medición de la concentración plaquetaria de MRP4-ARNm

- 35 Se amplificó ADN plaquetario con el procedimiento de PCR inversa según el procedimiento de Paul y otros, (Methods Mol Biol. 2004;273:435-54) usando cebadores anti MRP4 y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), obtenidos ambos en Applied Biosystems, en condiciones térmicas cíclicas estándar. En paralelo, se crearon curvas estándar de ADNc para la cuantificación de los resultados. Los resultados están documentados como expresión de los niveles de MRP4-ARNm estandarizados con GAPDH-ARNm. También pueden usarse otros estándares plaquetarios de ARNm constante.

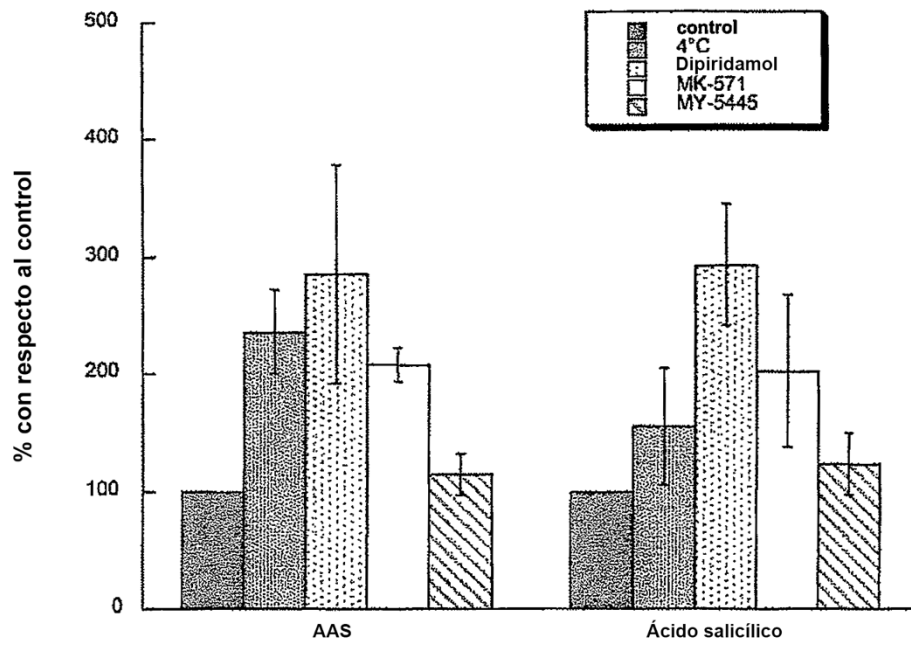
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la resistencia al AAS (ácido acetilsalicílico) *in vitro* en sujetos basado en determinar los niveles de MRP4 (proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos) en plaquetas, comprendiendo tal procedimiento las siguientes etapas:
- 5 (i) purificar una muestra de un fluido biológico para obtener una muestra plaquetaria;
- (ii) bien
- (a) ponerla en contacto con un anticuerpo mono o policlonal anti MRP4 durante un tiempo suficiente para la formación de un complejo entre el antígeno MRP4 y dicho anticuerpo, y detectar y medir tal complejo mediante transferencia de Western; o bien
- 10 (b) medir la concentración plaquetaria de MRP4-ARNm mediante transferencia de Southern o PCR en tiempo real;
- siendo dichos sujetos resistentes al AAS si presentan una expresión plaquetaria de MRP4 mayor que la de controles sanos.
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que dicho fluido biológico es sangre venosa periférica.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2 en el que la resistencia al AAS es debida a un tratamiento crónico con AAS o a causas genéticas.
4. El uso de un equipo de reactivos para llevar a cabo el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el equipo de reactivos, además del material para llevar a cabo el ensayo, también anticuerpos anti-MRP4 para el ensayo de evaluación mediante transferencia de Western; o enzimas de restricción específicas para la MRP4 que ha de ser cuantitativamente analizada, para determinar el ARNm plaquetario mediante transferencia de Southern o RT-PCR.
- 20 5. El uso según la reivindicación 4 que, además, comprende una preparación estándar de MRP4.
6. El uso de una composición que comprende AAS, sus derivados y sus sales fisiológicamente aceptables, en combinación con inhibidores de canal de MRP4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de pacientes necesitados de terapia con AAS y a los que se ha diagnosticado que son resistentes al AAS y que presentan una expresión plaquetaria de MRP4 mayor que la de controles sanos, diagnóstico que comprende determinar si un paciente es resistente al AAS llevando a cabo el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el inhibidor de canal de MRP4 se selecciona del grupo constituido por dipiridamol; mopidamol; MK-571; mefloquina, amocliaquina, cloroquina, primaquina, quinidina y quinina; di-butionina-(S,R)-sulfoximina; probenecid; S-(2,4-dinitrofenil)glutatió; N-acetil-(2,4-dinitro-fenil)cisteína; α -naftil- β -D-glucurónido; p-nitrofenil- β -D-glucurónido; flurbiprofeno; ibuprofeno; indometacina; indoprofeno; ketoprofeno; diclofenaco; disulfiram; las correspondientes sales fisiológicamente aceptables de dichos compuestos, y mezclas de los mismos.
- 25 7. El uso según la reivindicación 6 en el que el AAS y el inhibidor se preparan en formulaciones envasadas como formas de administración separadas de los ingredientes activos, para la administración coordinada simultánea o sucesiva de los ingredientes activos.
- 35 8. El uso según la reivindicación 6 o 7 en la que la composición del AAS y de los inhibidores comprende, además, excipientes, diluyentes, vehículos y adyuvantes.
9. El uso según la reivindicación 8 en el que los excipientes, diluyentes, vehículos y adyuvantes se seleccionan del grupo constituido por agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes emulsionantes, sustancias tampón y conservantes.
- 40 10. El uso según las reivindicaciones 6-9 en el que la composición se prepara en forma sólida, semisólida o líquida, en forma de grageas, cápsulas, píldoras, comprimidos, pastillas, granulados, jarabes, ampollas, gotas, soluciones, suspensiones, emulsiones, en dosificaciones unitarias o separadas, jarabes listos para su uso o unidades *ex tempore*, cremas y geles.
- 45 11. El uso según las reivindicaciones 6-10 en el que la composición se prepara en formulaciones que pueden ser administradas oralmente, parenteralmente, rectalmente, mediante administración tópica o mediante administración intramuscular, subcutánea, transdérmica o intravenosa.
12. El uso según las reivindicaciones 6-11 en el que la combinación de AAS y del inhibidor de MRP4 dipiridamol se administra en cantidades que oscilan, respectivamente, entre 75 y 150 mg/día en el caso del AAS y entre 75 y 500 mg/día, o de 75 a 200 mg/día, en el caso del dipiridamol.
- 50

13. El uso según las reivindicaciones 6-11 en el que la combinación de AAS más el inhibidor de MRP4 dipiridamol se administra en dosis diarias de 40 mg de AAS y 75 mg de dipiridamol.

Fig 1



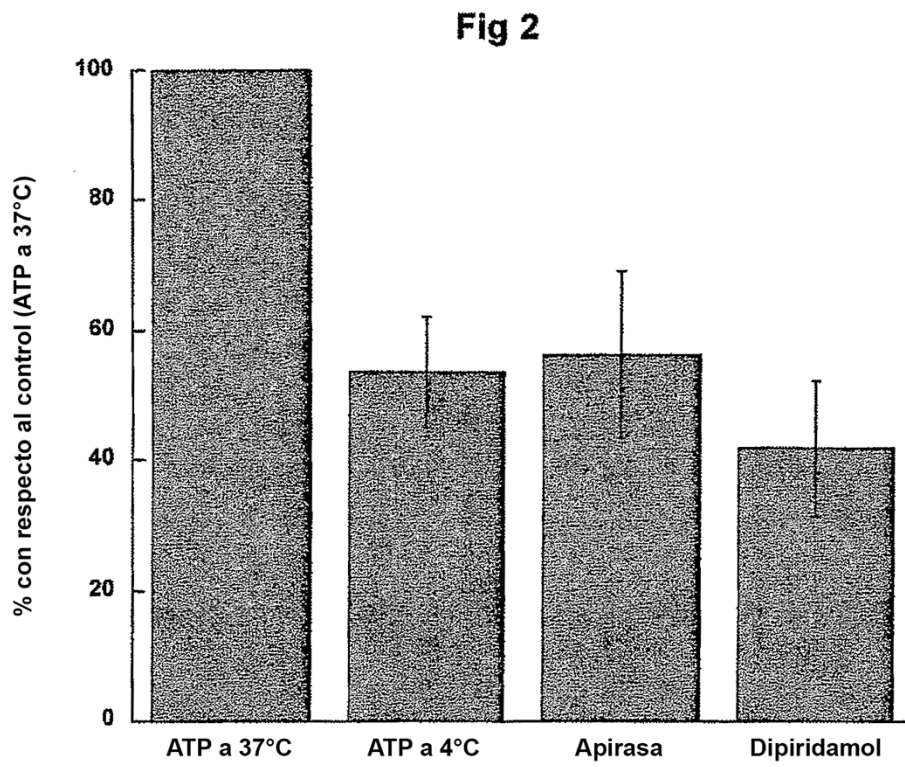


Fig 3

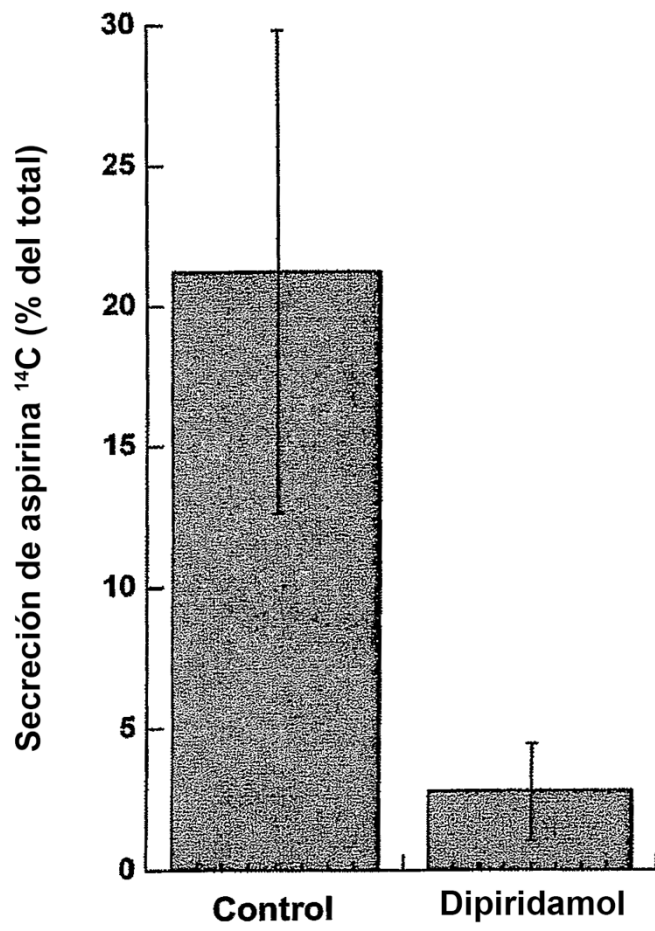
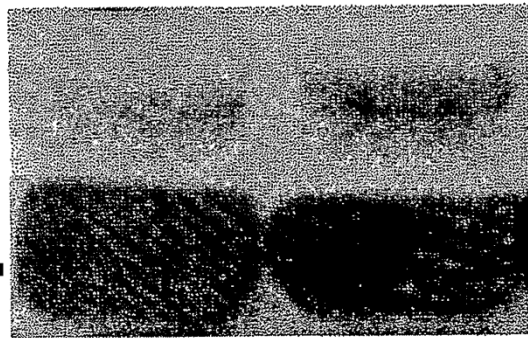


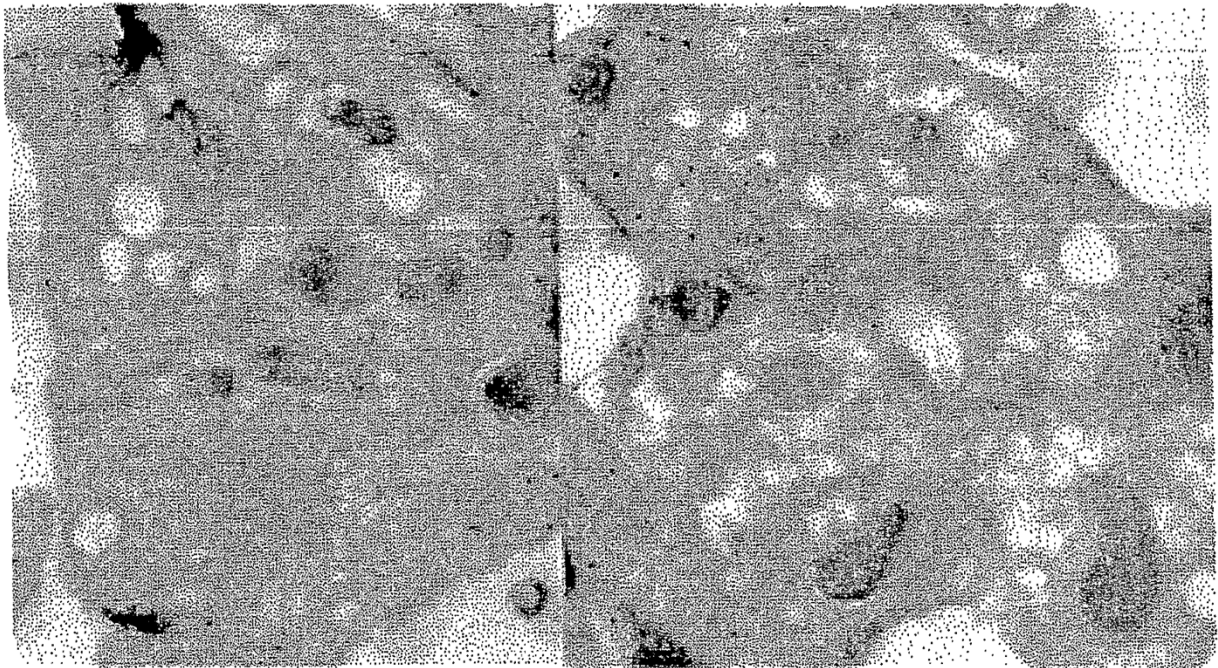
Fig 4

actina
de MRP4



HV **Pt**

Fig 5



A

B