

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 196**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2012** **E 12160688 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2508893**

54 Título: **Controles y kit para ensayos de actividad plaquetaria**

30 Prioridad:

04.04.2011 EP 11160934

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

02.10.2017

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**RECHNER, ANDREAS, DR. y
ZANDER, NORBERT, DR.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 635 196 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

Controles y kit para ensayos de actividad plaquetaria

La presente invención se encuentra en el campo de diagnósticos de coagulación y se refiere a un kit y a un procedimiento para la preparación de controles para el uso en procedimientos de ensayo para determinar la función plaquetaria. Los procesos fisiológicos que por un lado garantizan la fluidez de la sangre en el sistema vascular y por otra parte aseguran que se impida las pérdidas de sangre extravascular por medio de la formación de coágulos de sangre, se agrupan bajo el término hemostasis. En la regulación de la hemostasis participan una cantidad de factores de proteína así como también componentes celulares como, por ejemplo, los trombocitos (plaquetas sanguíneas). En el caso de una lesión vascular, primero ocurre una fijación de los trombocitos al colágeno subendotelial. Esta adhesión ocurre por medio de la proteína adhesiva tal como el factor de von Willebrand (VWF). Durante el proceso de adhesión se activan los trombocitos y los mediadores y se liberan los mediadores de sus gránulos, por lo cual se induce la agregación de más trombocitos así como una intensificación de la activación. De esta manera se efectúa una primera oclusión de la pared vascular (hemostasis primaria), que sólo se estabiliza por medio de otras reacciones del sistema de coagulación plasmática (hemostasis secundaria). Las regulaciones fallidas de estos procesos pueden conducir a una trombofilia o a una diátesis hemorrágica y pueden tener consecuencias letales dependiendo del grado de severidad.

En la diagnosis de coagulación se conocen diferentes procedimientos y sistemas con cuya ayuda puede determinarse si la sangre de un paciente puede coagularse correctamente o si se presenta un defecto de coagulación. En el caso de un defecto de coagulación, con frecuencia se requiere obtener conocimientos más precisos sobre las causas del defecto existente con el fin de poder seleccionar las medidas terapéuticas óptimas. Una subfunción importante del sistema de coagulación que puede estudiarse de manera dirigida es la hemostasis primaria que depende esencialmente de la funcionalidad plaquetaria.

Un procedimiento conocido para investigar la función plaquetaria es la determinación del tiempo de sangrado. Este es un ensayo global in vivo que detecta la hemostasis primaria. El tiempo de sangrado se determina infligiendo una pequeña herida por corte o por pinchazo y midiendo el tiempo hasta que se detiene el sangrado. Éste es un ensayo difícil de estandarizar, que ofrece información gruesa, que ante todo se aplica en situaciones de emergencia con el fin de lograr una visión en conjunto de la hemostasis primaria. La ingesta de inhibidores de agregación plaquetaria conduce a una prórroga del tiempo de sangrado. En la determinación de tiempo de sangrado es desventajoso que en el caso de un tiempo normal de sangrado no pueda excluirse un defecto de función plaquetaria.

Los procedimientos in vitro permiten una detección esencialmente más sensible de los defectos de función plaquetaria. En estos procedimientos habitualmente en una muestra de sangre entera o en una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP) se induce la agregación plaquetaria adicionando un activador y se mide la reacción de agregación. Los activadores usados conjuntamente, que se usan para la inducción de agregación plaquetaria, son ADP (adenosin-5'-difosfato), colágeno, epinefrina (adrenalina), ristocetina y diferentes combinaciones de los mismos, así como trombina, TRAP (proteína de activación del receptor de trombina) o serotonina.

En el estado de la técnica se conocen diversos procedimientos para investigar la función plaquetaria in vitro.

En la agregometría de transmisión de luz, que también se denomina agregación plaquetaria según Born, se mide de manera fotométrica en un agregómetro la capacidad de agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas en presencia de sustancias que inducen la agregación. Mediante la formación del agregado se incrementa la translucidez de la muestra de PRP de modo que puede determinarse la medición de translucidez, por ejemplo la velocidad de la formación del agregado. Con ayuda de la agregometría de transmisión de luz también pueden registrarse efectos terapéuticos de los inhibidores de agregación plaquetaria que se emplean como medicamentos. Una desventaja de la agregometría de transmisión de luz es que como material de muestra puede usarse exclusivamente plasma rico en plaquetas. Al plasma rico en plaquetas le hacen falta no solamente componentes importantes de la sangre como, por ejemplo, los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, sino que requiere además una preparación de la muestra que consume mucho tiempo y es propensa a errores.

El sistema VerifyNow® (Accumetrics) es un desarrollo ulterior de la agregometría de transmisión de luz que permite el estudio de la función plaquetaria en muestras de sangre entera. En este sistema, la reacción de agregación plaquetaria es amplificada adicionando micropartículas recubiertas con fibrinógeno. Reactivos y kits para la realización de este procedimiento se describen en la publicación WO 2005/007868 A2.

Otro principio de ensayo para determinar la función plaquetaria es el llamado sistema Platelet Function Analyzer System [Sistema analizador de función plaquetaria], abreviadamente sistema PFA (PFA-100®, PFA-200, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania). Con ayuda del sistema PFA se mide la hemostasis primaria en muestras de sangre entera, en condiciones de flujo y, por lo tanto, en presencia de altas fuerzas cortantes.

Para simular las condiciones de flujo y las fuerzas cortantes tal como rigen en los vasos sanguíneos arteriales más pequeños, en una celda de medición de PFA que se emplea en un instrumento de análisis de PFA, se genera una

- presión negativa de aproximadamente -40 mbares y la sangre entera citratada que se encuentra en un reservorio de muestras fluye por un capilar que tiene un diámetro de aproximadamente 200 μm . El capilar desemboca en una cámara de medición que está cerrada con un elemento de separación, por ejemplo una membrana, que contiene una abertura central capilar a través de la cual pasa la sangre debido a la presión negativa. En la mayoría de los casos, la membrana, al menos en el sector alrededor de la abertura, se desplaza con uno o varios activadores que inducen la agregación plaquetaria, de modo que la sangre que fluye a lo largo se pone en contacto con las sustancias inductoras de agregación en el sector de la abertura. A causa de la subpresión inducida y de la agregación plaquetaria, en el sector de la abertura, se forma un tapón de trombocitos (trombo), el cual cierra la abertura de la membrana y detiene el flujo de sangre. En este sistema se mide el tiempo que se necesita hasta el cierre de la abertura de membrana. Este, así llamado, tiempo de cierre se correlaciona con la funcionalidad plaquetaria. Habitualmente se usan celdas de medición que están equipadas con una membrana la cual está recubierta con colágeno (Col) y adicionalmente ya sea con ADP o con epinefrina (Epi). Otras celdas de medición que son adecuadas para la determinación de antitrombóticos del grupo de los antagonistas de P2Y(12), como por ejemplo de clopidogrel, están equipadas con una membrana que contiene ADP y prostaglandina E1 (EP-A1-1850134).
- Otro principio de ensayo para la determinación de la función plaquetaria es el sistema Multiplate® (Verum Diagnostica GmbH, Múnich, Alemania). Con ayuda del sistema Multiplate en muestras de sangre entera se mide la hemostasis primaria con base en la agregometría de impedancia. Para este propósito dos unidades de sensor que se componen de dos alambres de sensor dispuestos en paralelo y que se encuentran dispuestos en una celda de medición especial, se sumergen en la muestra de sangre entera. Adicionando activadores plaquetarios tales como, por ejemplo, ADP, colágeno o ácido araquidónico, se induce la agregación plaquetaria. Los trombocitos se adhieren a la superficie del alambre sensor, por lo cual se incrementa la resistencia eléctrica entre los alambres sensores. El incremento de la resistencia eléctrica medido se correlaciona con la función plaquetaria.
- Hasta ahora no se ha logrado preparar un material de control o estándar que sea funcional y estable a largo plazo, que sea adecuado para el control o la estandarización de ensayos de función plaquetaria, que ensayan la función plaquetaria en sangre entera.
- Las publicaciones US 4,338,564 y US 4,358,394 describen procedimientos para la preparación de materiales hematológicos de control, que sean adecuados para el uso en la citometría, porque en estas preparaciones se caracterizan principalmente la cantidad, la forma y el tamaño de las células sanguíneas. Sin embargo, estas preparaciones no son adecuadas para investigar la función plaquetaria porque las células se tratan con medios de fijación y otras sustancias que modifican la membrana celular.
- El objetivo fundamental de la presente invención fue proporcionar un material de control para ensayos de función plaquetaria en sangre entera.
- El objetivo se logra proporcionando un kit capaz de almacenarse el cual permita al usuario de un ensayo de función plaquetaria preparar controles estandarizados de una manera sencilla.
- La invención se refiere, por lo tanto, a un kit de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 para preparar controles para un procedimiento para determinar la función plaquetaria, en el cual el kit contiene al menos un primer liofilizado para la preparación de un primer control con función plaquetaria normal y un segundo liofilizado para la preparación de un segundo control con función plaquetaria anormalmente reducida.
- Para la preparación de controles, cada liofilizado se disuelve en sangre entera que presenta una función plaquetaria normal.
- Cada liofilizado de un kit según la invención se compone al menos de una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico y una sustancia auxiliar para la liofilización.
- El valor de pH fisiológico de la sangre se encuentra habitualmente entre aproximadamente 7,35 y 7,45. Las sustancias reguladoras de pH preferidas para mantener un valor de pH fisiológico son HEPES (ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etanosulfónico), PBS (solución de cloruro de sodio con pH regulado mediante fosfato), OVB (regulador de pH veronal de Owren), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico), PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico), TAPS (ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico), CHES (ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico), CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico), Tris (tris(hidroximetil)-aminometano) o MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico).
- Sustancias auxiliares preferidas para la liofilización son sustancias del grupo de los disacáridos, que entre otros comprenden sacarosa, lactosa, trehalosa y maltosa y del grupo de los alcoholes, preferiblemente polietilenglicol, manitol y sorbitol. Estas sustancias tienen efecto crioprotector y lioprotector, es decir que protegen otros componentes de la preparación durante el congelamiento y la liofilización.
- El liofilizado para la preparación de un control con función plaquetaria normal se encuentra libre de sustancias que influyan en la función plaquetaria.

Un liofilizado para la preparación de un control con función plaquetaria anormalmente reducida contiene adicionalmente al menos un inhibidor directo de la agregación plaquetaria del grupo de tirofiban, abxicimab, eptifibatid, ácido acetilsalicílico, MRS 2395, AR-C66096, cangrelor, ticagrelor, cilostazol, dipyridamol, prostaglandina E1 (PGE1), prostaciclina, iloprost, cicaprost, forskolina, 2-MeSAMP (2-metiloadenosin-5'-monofosfato), C1330-7 (N1-(6-etoxi-3,3-benzotiazol-2-il-2-(7-etoxi-4-hidroxi-2,2-dioxo-2H-2-6benzo[4,5][1,3]tiazolo[2,3-c][1,2,4]tiadiazin-3-il)-2-oxo-1-etansulfonamida), MRS 2179 (sal diamonio de 2'-desoxi-N6-metiladenosin-3',5'-difosfato), MRS 2279 ((N)-metanocarba-N6-metil-2-cloro-2'-desoxiadenosin-3',5'-bisfosfato), MRS 2500 (2-yodo-N6-metil-(N)-metanocarba-2'-desoxiadenosin-3',5'-bisfosfato), A2P5P (adenosin-2',5'-bisfosfato), A3P5P (adenosin-3',5'-bisfosfato) y A3P5PS (adenosin-3'-fosfat,5'-fosfosulfato). Por un inhibidor directo de la agregación plaquetaria se entiende una sustancia que tiene un efecto directo en la función plaquetaria como, por ejemplo, mediante bloqueo de los receptores ADP plaquetarios, inhibición plaquetaria de la ciclooxigenasa (COX) o bloqueo de los receptores plaquetarios GP-IIb/IIIa. Los inhibidores directos de la agregación plaquetaria deben distinguirse de los llamados anticoagulantes que despliegan su efecto inhibiendo factores plasmáticos de coagulación, tales como trombina o el factor Xa y pueden tener de esta manera indirectamente una influencia en la función plaquetaria. En contraposición a los anticoagulantes, los inhibidores directos de la agregación plaquetaria no producen, por ejemplo, una prórroga del tiempo de coagulación en un ensayo de coagulación en plasma.

Un liofilizado para la preparación de un control con una función plaquetaria anormalmente reducida contiene al menos un inhibidor directo de la agregación plaquetaria en una cantidad tal que un control pueda ser capaz de prepararse, que preferiblemente presente una función plaquetaria de aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, de modo particularmente preferido de aproximadamente 70% de la función plaquetaria normal.

Un kit preferido contiene varios liofilizados diferentes para la preparación de controles con función plaquetaria anormalmente reducida. Estos liofilizados diferentes pueden contener ellos mismos un inhibidor directo de la agregación plaquetaria aunque en cantidad diferente. Como alternativa, los liofilizados pueden contener inhibidores directos de la agregación plaquetaria que son diferentes.

Un kit de ensayo particularmente preferido contiene liofilizados que contienen adicionalmente plasma normal humano. Esto tiene la ventaja de que se compensan deficiencias cualesquiera de los componentes de plasma en la muestra de sangre entera, en la cual el liofilizado se disuelve al preparar el material de control. Concentraciones más bajas de componentes determinados de plasma, como por ejemplo concentraciones bajas del factor de von Willebrand (VWF), pueden influir la determinación de la actividad plaquetaria. Introduciendo estos componentes en forma de plasma normal humana, se garantiza una concentración mínima de todos los componentes plasmáticos, de modo que se logra una estabilización de la función plaquetaria control y, por lo tanto, una estandarización mejorada de los resultados del ensayo. Un liofilizado de un kit de ensayo de acuerdo con la invención contiene plasma normal humana, preferiblemente en una cantidad tal que pueda prepararse un control que contiene después de disolverse en sangre entera aproximadamente 2% a aproximadamente 20% en volumen de plasma normal humana.

Otro kit particularmente preferido contiene liofilizados que adicionalmente contienen factor humano de von Willebrand (VWF), aislado. Éste tiene la ventaja de que se compensan deficiencias cualesquiera del VWF en la muestra de sangre entera, en la cual se disuelve el liofilizado durante la preparación del material de control. Esto provoca una estabilización de la función plaquetaria en un control y, por lo tanto, una estandarización mejorada de los resultados del ensayo. Un liofilizado de un kit ensayo de acuerdo con la invención contienen factor de von Willebrand, preferiblemente factor humano de von Willebrand, aislado, preferiblemente en una cantidad tal que pueda prepararse un control que contienen después de disolverse en sangre entera aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 IU/mL de VWF, de modo particularmente preferido 0,1 a aproximadamente 1,0 IU/mL de VWF, de modo muy particularmente preferido 0,1 a aproximadamente 0,5 IU/mL de VWF.

El término "liofilizado" comprende productos finales de la liofilización.

Para la preparación de los liofilizados de un kit de acuerdo con la invención habitualmente se preparan primero soluciones acuosas que contienen las sustancias deseadas en las concentraciones deseadas. Las soluciones se exponen en los recipientes, preferiblemente en viales de vidrio, en forma de alícuotas y a continuación se liofilizan. Los residuos en forma de polvo, anhidros, se cierran luego de modo hermético al aire y pueden almacenarse durante varios meses, dado el caso incluso años.

Un kit de ensayo según la invención contiene preferiblemente varios recipientes, de manera más preferida varios viales de vidrio o de plástico los cuales contienen los diferentes liofilizados de forma cerrada, herméticos al aire.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de controles para un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria. La preparación de los controles se efectúa de tal manera que se usa un kit de acuerdo con la invención el cual contiene diferentes liofilizados. Los diferentes liofilizados se disuelven en sangre entera con función plaquetaria normal. De manera más preferida, la sangre entera es una muestra de sangre entera fresca de un donante sano. La sangre entera es anticoagulada preferiblemente con una sustancia del grupo de citrato, hirudina, PPACK (D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometil cetona), BAPA (bencilsulfonil-D-Arg-Pro-4-amidinobenzilamida) y heparina.

La preparación de los controles disolviendo los liofilizados en sangre entera se efectúa preferiblemente sólo en el aplicador de un procedimiento para determinar la función plaquetaria.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos de realización sirven para ilustrar la invención y no deben entenderse como una limitación.

- 5 Ejemplo 1: Preparación de un kit de ensayo de acuerdo con la invención y preparación de controles para un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria

Fue preparado un kit de ensayo para la preparación de controles que son adecuados, entre otros, para el uso en ensayos de función plaquetaria de acuerdo con el principio de ensayo del llamado Platelet Function Analyzer Systems (PFA-100®, PFA-200, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania).

- 10 Con ayuda del sistema PFA se mide la hemostasis primaria en muestras de sangre entera, en condiciones de flujo y, por lo tanto, en presencia de fuerzas cortantes altas. Como medida para la función plaquetaria, se mide en este sistema el tiempo que se necesita hasta el cierre de una abertura de membrana en una celda de medición especial (tiempo de cierre). Las celdas de medición, que están equipadas con diferentes tipos de membrana, permiten la determinación de diferentes funciones plaquetarias. Fueron usadas celdas de medición que estaban equipadas con una membrana la cual estaba recubierta con colágeno (Col) y con ADP (Col/ADP), o la cual estaba recubierta con colágeno (Col) y con epinefrina (Epi) (Col/Epi), o que estaba recubierta con ADP y prostaglandina E1 (INNOVANCE® PFA P2Y).

- 15 Debíó prepararse un control que proporcionaba una función plaquetaria normal con todos los tres tipos de celdas de medición (control normal, nivel 1). Además, debíó producirse un control que proporcionaba una función plaquetaria anormalmente reducida con todos los tres tipos de celdas de medición (control anormal, nivel 2). Además, debíó prepararse un control que proporcionara una función plaquetaria anormalmente reducida solamente con celdas de medición de Col/Epi, aunque una función plaquetaria con los otros dos tipos de celdas de medición (control anormal Col/Epi, nivel 2). Además, debíó producirse un control que proporcionara una función plaquetaria anormalmente reducida solamente con celdas de medición INNOVANCE®, aunque una función plaquetaria normal con los otros dos tipos de celda de medición (control anormal P2Y, nivel 2).

- 25 Las funciones plaquetarias deseadas de los diferentes controles se recopilan en la Tab. 1.

Tabla 1: Funciones plaquetarias de los diferentes controles

Celda de medición PFA	Control normal (Nivel 1)	Control anormal (Nivel 2)	Control anormal Col/EPI (Nivel 2)	Control anorma P2Y (Nivel 2)
Col/EPI	Normal	Abnormal	Anormal	Normal
Col/ADP	Normal	Anormal	Normal	Normal
INNOVANCE PFA P2Y	Normal	Anormal	Normal	Anormal

En la Tab. 2 se encuentran listadas las sustancias que han sido usadas para la preparación de los liofilizados. Primero han sido preparadas soluciones madre en las concentraciones indicadas en agua destilada.

- 30 Tabla 2: Soluciones madre de las sustancias usadas

Sustancia	Concentración de la solución madre
HEPES	238 g/mol
D-Manitol	182 g/mol
Ácido acetilsalicílico (ASS)	2,5 g/L
Tirofiban clorhidrato	10 mg/mL
Prostaglandina E1	5 mg/mL
AR-C 66096	10 mM

- 35 Para cada control han sido dosificadas con pipeta cantidades definidas de las soluciones madre de las sustancias deseadas en viales de vidrio (GW 5). La cantidad de la solución madre que va a dosificarse con pipeta ha sido calculada de tal manera que se encontraba presente una concentración final deseado de las sustancias en el control terminado. Los controles debieron prepararse adicionando un volumen respectivamente de 2 mL de sangre entera. Las concentraciones finales de las sustancias en los diferentes controles terminados se recopilan en la Tab. 3.

Las mezclas líquidas en los viales de vidrio GW 5 fueron liofilizadas a continuación en una planta de liofilización de acuerdo con el siguiente programa: cuatro horas congeladas a -40°C con 40 % de vacío, después secado durante 8 horas a +20°C.

Tabla 3: Concentración final de las sustancias en 2 mL de sangre entera

	Control normal (Nivel 1)	Control anormal (Nivel 2)	Control anormal Col/EPI (Nivel 2)	Control anormal P2Y (Nivel 2)
Inhibidor plaquetario	-	0,1 µg/mL Tirofiban	10 nM PGE1 + 50 µM ASS	200 nM AR- C66096
Regulador de pH	5 mM HEPES	5 mM HEPES	5 mM HEPES	5 mM HEPES
Sustancias auxiliares	0,001 % Manitol	0,001 % Manitol	0,001 % Manitol	0,001 % Manitol

Los liofilizados de los controles descritos en la Tab. 3 fueron disueltos respectivamente en 2 mL de sangre entera citratada de un donante sano por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

Ejemplo 2: Uso de controles preparados de acuerdo con la invención en un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria en el sistema PFA

La función plaquetaria de los controles preparados de acuerdo con el ejemplo 1 fue medida con todas las tres celdas de medición PFA o con celdas de medición individuales en determinación doble en un analizador de PFA. En paralelo fueron medidas las mismas muestras de sangre entera en estado nativo (es decir, sin adición de liofilizados) las cuales han sido usadas para disolver los liofilizados.

Para los tres tipos diferentes de celda de medición habían sido determinados previamente los valores límite (cut-offs) para el tiempo de cierre (en segundos), los cuales permitieron la diferenciación entre una función plaquetaria normal y una anormalmente reducida. Las muestras con una función plaquetaria anormalmente reducida presentan un tiempo de cierre prolongado que se encuentra por encima del cut-off. Los cut-offs para los diferentes tipos de celdas de medición se recopilan en la Tab. 4.

Tabla 4: Cut-offs de los tres tipos de celdas de medición de PFA

	Col/EPI	Col/ADP	INNOVANCE PFA P2Y
Cut-off	165 s	119 s	106 s

Control normal (nivel 1) (HEPES + Mannitol)

El control normal (nivel 1) que había sido preparado disolviendo HEPES liofilizado y manitol en sangre entera, presenta tiempos de cierre ligeramente prorrogados pero normales frente a las muestras nativas de sangre entera. En la Tab. 5 se muestran los tiempos medios de cierre de las muestras nativas de sangre entera en comparación con los tiempos medios de cierre de un control normal (nivel 1) en los diferentes tipos de celda de medición (pruebas de sangre entera en forma de alícuotas en total de 14 donantes sanos).

Tabla 5: Tiempos medios de cierre del control normal (nivel 1)

Celda de medición	Cut-off	Sangre entera nativa	Control normal (Nivel 1)
Col/Epi	165 s	99 s	112 s
Col/ADP	119 s	85 s	90 s
INNOVANCE PFA P2Y	106 s	64 s	74 s

Control anormal (nivel 2) (HEPES + manitol + tirofiban)

Puesto que tirofiban bloquea el receptor activado de GPIIb/IIIa de los trombocitos, esto impide la agregación plaquetaria independientemente del tipo de activación o del tipo de celda de medición. Las primeras investigaciones fueron realizadas, por lo tanto, solamente con la celda de medición Col/ADP activada de la manera más fuerte. El control anormal (nivel 2) que había sido preparado disolviendo HEPES liofilizado, manitol y tirofiban en sangre entera, presenta tiempos medios de cierre anormales, ostensiblemente prorrogados frente a las muestras nativas de sangre entera y frente a los controles normales (nivel 1), por encima del cut-off, con el tipo de celda de medición Col/ADP. En la tabla 6 se muestran los tiempos medios de cierre de muestras nativas de sangre entera y de controles normales (nivel 1) en comparación con los tiempos medios de cierre de un control anormal (nivel 2) en celdas de medición de Col/ADP (muestras de sangre entera en forma de alícuotas en total de 14 donantes sanos).

Tabla 6: Tiempo medio de cierre de Col/ADP del control anormal (nivel 2)

Celda de medición	Cut-off	Sangre entera nativa	Control normal (Nivel 1)	Control anormal (Nivel 2)
Col/ADP	119 s	87 s	93 s	287 s

Control anormal Col/EPI (Nivel 2) (HEPES + manitol + ácido acetilsalicílico + prostaglandina E1)

El control Col/Epi (nivel 2) anormal, específico de Col/Epi, el cual había sido preparado disolviendo HEPES liofilizado, manitol, ácido acetilsalicílico y PGE1 en sangre entera, presenta con el tipo de celda de medición Col/Epi, frente a las muestras nativas de sangre entera y frente a los controles normales (nivel 1) tiempos de cierre anormales, ostensiblemente prorrogados por encima del cut-off. En la Tab. 7 se muestran los tiempos medios de cierre de muestras nativas de sangre entera y de controles normales (Nivel 1) en comparación con los tiempos medios de cierre de un control anormal Col/Epi (nivel 2) en celdas de medición de Col/Epi (muestras de sangre entera en forma de alícuotas en total de 10 donantes sanos).

Tabla 7: Tiempo medio de cierre Col/Epi del control anormal Col/Epi (nivel 2)

Celda de medición	Cut-off	Sangre entera nativa	Control normal (Nivel 1)	Control anormal Col/Epi (Nivel 2)
Col/Epi	165 s	106 s	117 s	279 s

Control anormal P2Y (nivel 2) (HEPES + manitol + AR-C66096)

El control anormal específico P2Y de INNOVANCE PFA (nivel 2), que había sido preparado disolviendo HEPES liofilizado, manitol y AR-C66096 en sangre entera, presenta con el tipo de celda de medición INNOVANCE PFA P2Y frente a las muestras nativas de sangre entera y frente a los controles normales (nivel 1) tiempos de cierre ostensiblemente prorrogados, anormales, por encima del cut-off (véase la Fig. 4). En la Tab. 8 se muestran los tiempos medios de cierre de muestras nativas de sangre entera y de controles normales (nivel 1) en comparación con los tiempos medios de cierre de un control anormal P2Y (nivel 2) en celdas de medición P2Y de INNOVANCE PFA (muestras de sangre entera en forma de alícuotas en total de 4 donantes sanos).

Tabla 8: Tiempo medio de cierre P2Y de INNOVANCE del control anormal P2Y (nivel 2)

Celda de medición	Cut-off	Sangre entera nativa	Control normal (Nivel 1)	Control anormal P2Y (Nivel 2)
INNOVANCE PFA P2Y	106 s	79 s	79 s	300 s

En la Tab. 9 se muestran los tiempos medios de cierre de muestras nativas de sangre entera y, por lo tanto, de controles normales y anormales preparados de acuerdo con la invención en los tres tipos diferentes de celdas de medición de PFA (muestras de sangre entera en forma de alícuotas en total de 4 donantes sanos). Los controles preparados de acuerdo con la invención presentan las actividades plaquetarias deseadas (compárese con Tab. 1).

Tabla 9: Tiempos medios de cierre de los cuatro controles diferentes en los tres tipos de celdas de medición diferentes

Celda de medición PFA	Sangre entera nativa	Control normal (Nivel 1)	Control anormal (Nivel 2)	Control anormal Col/EPI (Nivel 2)	Control anormal P2Y (Nivel 2)
Col/EPI Cut-off: 165 s	119 s	133 s (normal)	300 s (anormal)	282 s (anormal)	152 s (normal)
Col/ADP Cut-off: 119 s	100 s	108 s (normal)	300 s (anormal)	109 s (normal)	116 s (normal)
INNOVANCE PFA P2Y Cut-off: 106 s	79 s	79 s (normal)	300 s (anormal)	90 s (normal)	300 s (anormal)

REIVINDICACIONES

1. Kit para la preparación de controles para un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria, y el kit contiene los siguientes componentes:
 - a. Un primer liofilizado para la preparación de un primer control con función plaquetaria normal, en cuyo caso el liofilizado se compone de los siguientes componentes:
 - una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico, y
 - una sustancia auxiliar para la liofilización; y
 - b. Un segundo liofilizado para la preparación de un segundo control con función plaquetaria anormalmente reducida, en cuyo caso el liofilizado se compone de los siguientes componentes:
 - una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico, y
 - una sustancia reguladora de pH para la liofilización, y
 - un inhibidor directo de la agregación plaquetaria del grupo de tirofiban, abxicimab, eptifibatid, ácido acetilsalicílico, MRS 2395, AR-C66096, cangrelor, ticagrelor, cilostazol, dipyridamol, prostaglandina E1, prostaciclina, iloprost, cicaprost, forskolina, 2-MeSAMP, C1330-7, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P y A3P5PS.
2. Kit para la preparación de controles para un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria, y el kit contiene los siguientes componentes:
 - a. un primer liofilizado para la preparación de un primer control con función plaquetaria normal, en cuyo caso el liofilizado se compone de los siguientes componentes:
 - una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico, y
 - una sustancia auxiliar para la liofilización, y
 - plasma normal humana; y
 - b. un segundo liofilizado para la preparación de un segundo control con función plaquetaria anormalmente reducida, en cuyo caso el liofilizado se compone de los siguientes componentes:
 - una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico, y
 - una sustancia auxiliar para la liofilización, y
 - un inhibidor directo de la agregación plaquetaria del grupo de tirofiban, abxicimab, eptifibatid, ácido acetilsalicílico, MRS 2395, AR-C66096, cangrelor, ticagrelor, cilostazol, dipyridamol, prostaglandina E1, prostaciclina, iloprost, cicaprost, forskolina, 2-MeSAMP, C1330-7, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P y A3P5PS y
 - plasma normal humana.
3. Kit para la preparación de controles para un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria, y el kit contiene los siguientes componentes:
 - a. un primer liofilizado para la preparación de un primer control con función plaquetaria normal, en cuyo caso el liofilizado se compone de los siguientes componentes:
 - una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico, y
 - una sustancia auxiliar para la liofilización, y
 - factor humano de von Willebrand; y
 - b. un segundo liofilizado para la preparación de un segundo control con función plaquetaria anormalmente reducida, en cuyo caso el liofilizado se compone de los siguientes componentes:
 - una sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico, y
 - una sustancia auxiliar para la liofilización, y

- un inhibidor directo de la agregación plaquetaria del grupo de tirofiban, abxicimab, eptifibatid, ácido acetilsalicílico, MRS 2395, AR-C66096, cangrelor, ticagrelor, cilostazol, dipyridamol, prostaglandina E1, prostaciclina, iloprost, cicaprost, forskolina, 2-MeSAMP, C1330-7, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P y A3P5PS y

-factor humano de von Willebrand.

- 5 4. Kit de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el cual la sustancia reguladora de pH para mantener un valor de pH fisiológico se selecciona del grupo de HEPES, PBS, OVB, MES, PIPES, TAPS, CHES, CAPS, Tris y MOPS.
5. Kit de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el cual la sustancia auxiliar para la liofilización es un disacárido, preferiblemente un disacárido del grupo de sacarosa, lactosa, trehalosa y maltosa.
- 10 6. Kit de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el cual la sustancia auxiliar para la liofilización es un alcohol, preferiblemente un alcohol del grupo de polietilenglicol, manitol y sorbitol.
- 15 7. Kit de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el cual el segundo liofilizado contiene un inhibidor directo de la agregación plaquetaria en una cantidad de modo que pueda prepararse un control que presenta una función plaquetaria de entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 80 %, de preferencia aproximadamente de 70 % de la función plaquetaria normal.
- 20 8. Kit de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, y el kit contiene además al menos otro liofilizado para la preparación de al menos otro control con función plaquetaria anormalmente reducida, en el cual el al menos otro liofilizado contiene el mismo inhibidor directo de la agregación plaquetaria que el segundo liofilizado, aunque en una cantidad diferente y el al menos otro liofilizado contiene otro inhibidor directo de la agregación plaquetaria diferentes del del segundo liofilizado.
- 25 9. Procedimiento para la preparación de controles para un procedimiento para la determinación de la función plaquetaria, caracterizado porque se usa un kit de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes y en cuyo caso cada uno de los liofilizados contenidos en el kit se disuelve en sangre entera con función plaquetaria normal.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual la sangre entera con función plaquetaria normal es una muestra de sangre entera de un donante sano.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 o 10, en el cual la sangre entera es anticoagulada con citrato, hirudina, PPACK, BAPA o heparina.