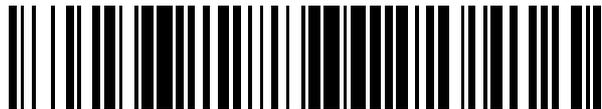


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 995**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2013 PCT/JP2013/083688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14098056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2013 E 13865021 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2937695**

54 Título: **Procedimiento para medir la generación de trombina**

30 Prioridad:

18.12.2012 JP 2012275671

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

02.04.2019

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**MORISHIMA, YOSHIYUKI y
HONDA, YUKO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 706 995 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 medir la generación de trombina

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir la generación de trombina.

5 Antecedentes de la técnica

Se conoce un procedimiento para medir la generación de trombina en el plasma como un indicador para evaluar la capacidad de trombosis y de hemostasis *in vivo* (por ejemplo, bibliografía de patentes 1, 2, 3). Además, también se conoce un procedimiento de medición para evaluar el efecto de un agente antiplaquetario en la generación de trombina (por ejemplo, bibliografía no de patentes 1). Además, también se conoce un procedimiento de medición para evaluar el efecto de una combinación de un agonista de plaquetas y un factor VIIa en la generación de trombina (por ejemplo, bibliografía no de patentes 2).

Lista de citas**Bibliografía de patentes**

15 Bibliografía de patentes 1: WO 03/093831
Bibliografía de patentes 2: WO 2006/117246
Bibliografía de patentes 3: patente de Estados Unidos n.º 5192689

Bibliografía no de patentes

20 Bibliografía no de patentes 1: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, vol. 40, n.º 4/2002 (135-141)
Bibliografía no de patentes 2: Thrombosis Journal 2006, 4: 5

Sumario de la invención**Problema técnico**

En la actualidad, se usan agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, anticoagulantes y similares. Los agentes antiplaquetarios y los anticoagulantes evitan la formación de trombos basándose en diferentes mecanismos. La actividad farmacológica de un agente antiplaquetario puede revelarse, por ejemplo, midiendo la actividad inhibitoria del agente sobre la agregación plaquetaria, mientras que la actividad farmacológica de un anticoagulante puede revelarse, por ejemplo, midiendo la actividad de prolongación del agente sobre el tiempo de coagulación de la sangre. Sin embargo, básicamente, el agente antiplaquetario no influye en el tiempo de coagulación de la sangre, y el anticoagulante no influye en la agregación plaquetaria.

30 Por lo tanto, incluso si se ha aplicado un procedimiento de medición del tiempo de coagulación de la sangre o la agregación plaquetaria al uso combinado de estos agentes, no podrían evaluarse los efectos combinados.

En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de medición capaz de evaluar fácilmente efectos combinados en un único sistema de ensayo, cuando se usan en combinación agentes antitrombóticos que tienen diferentes mecanismos de acción.

35 Solución al problema

La presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Un procedimiento *in vitro* para medir la generación de trombina que comprende:

- 40 (a) una etapa para añadir un anticoagulante, un inhibidor del receptor P2Y₁₂, difosfato de adenosina y un factor tisular al plasma rico en plaquetas;
(b) una etapa para añadir un sustrato de trombina fluorogénico y una solución que contiene calcio al mismo; y
(c) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia,

en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (a) es de 5 a 20 µM; y

la concentración final del factor tisular en la etapa (a) es de 0,05 a 0,25 pM.

45 (2) El procedimiento de acuerdo con el punto (1) anterior, en el que el anticoagulante es un inhibidor del factor Xa.

(3) El procedimiento de acuerdo con el punto (2) anterior, en el que el inhibidor del factor Xa es Edoxabán.

(4) El procedimiento de acuerdo con uno de los puntos (1) a (3) anteriores, en el que el inhibidor del receptor P2Y₁₂ es Clopidogrel o Ticagrelor.

50 (5) Un procedimiento *in vitro* para medir la generación de trombina que comprende:

(a1) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;
 (b1) una etapa para añadir difosfato de adenosina y factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido;
 (c1) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo; y
 (d1) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia

en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (b1) es de 5 a 20 μ M; y

la concentración final del factor tisular en la etapa (b1) es de 0,05 a 0,25 pM.

(6) Un procedimiento *in vitro* para evaluar los efectos combinados de un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂, que comprende:

(a2) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;

(b2) una etapa para añadir difosfato de adenosina y factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido;

(c2) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo;

(d2) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia;

(e2) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante o un inhibidor del receptor P2Y₁₂, o al que no se ha administrado ninguno de los agentes;

(f2) una etapa para añadir difosfato de adenosina y factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido;

(g2) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo;

(h2) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia; e

(i2) una etapa para comparar el valor obtenido en la etapa (d2) con el valor obtenido en la etapa (h2);

en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en las etapas (b2) y (f2) es de 5 a 20 μ M; y

la concentración final del factor tisular en las etapas (b2) y (f2) es de 0,05 a 0,25 pM.

(7) Un procedimiento *in vitro* para medir la generación de trombina que comprende:

(a3) una etapa para añadir el difosfato de adenosina y el factor tisular al plasma rico en plaquetas que contiene un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;

(b3) una etapa para añadir un sustrato de trombina fluorogénico y una solución que contiene calcio al mismo; y

(c3) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia

en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (a3) es de 5 a 20 μ M; y

la concentración final del factor tisular en la etapa (a3) es de 0,05 a 0,25 pM.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención tiene el efecto de medir fácilmente los efectos combinados de los agentes antitrombóticos. Además, la presente invención también tiene el efecto de predecir un riesgo de hemorragia provocado por la administración de un anticoagulante y/o un inhibidor del receptor P2Y₁₂, usando la generación de trombina como indicador.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el efecto del ADP solo (concentración: 5 a 20 μ M) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

La figura 2 muestra la influencia del ADP y el TF sobre la generación de trombina (mediciones por triplicado). La gráfica superior muestra el efecto del ADP (10 μ M) sobre la generación de trombina. La gráfica intermedia muestra el efecto del ADP (10 μ M) y el TF (0,05 pM) sobre la generación de trombina. La gráfica inferior muestra el efecto del ADP (10 μ M) y el TF (0,25 pM) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

La figura 3A muestra los efectos del control, Clopidogrel (10 μ g/mL), Edoxabán (40 ng/mL) y Clopidogrel (10 μ g/mL) + Edoxabán (40 ng/mL) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

La figura 3B muestra los efectos del control, Clopidogrel (10 μ g/mL), Edoxabán (80 ng/mL) y Clopidogrel (10 μ g/mL) + Edoxabán (80 ng/mL) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

La figura 3C muestra los efectos del control, Clopidogrel (20 μ g/mL), Edoxabán (40 ng/mL) y Clopidogrel (20 μ g/mL) + Edoxabán (40 ng/mL) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de

trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

La figura 3D muestra los efectos del control, Clopidogrel (20 µg/mL), Edoxabán (80 ng/mL) y Clopidogrel (20 µg/mL) + Edoxabán (80 ng/mL) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

5 La figura 4 muestra los efectos del Edoxabán y/o el Clopidogrel sobre los parámetros de la generación de trombina. A indica tiempo de retraso, B indica ETP, C indica pico, D indica tiempo hasta pico y E indica MáxR.

La figura 5A muestra los efectos del control, Ticagrelor (3 µg/mL), Edoxabán (40 ng/mL) y Ticagrelor (3 µg/mL) + Edoxabán (40 ng/mL) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

10 La figura 5B muestra los efectos del control, Ticagrelor (3 µg/mL), Edoxabán (80 ng/mL) y Ticagrelor (3 µg/mL) + Edoxabán (80 ng/mL) sobre la generación de trombina. El eje longitudinal indica una concentración de trombina (nM), y el eje horizontal indica un tiempo (min).

La figura 6 muestra los efectos del Edoxabán y/o el Ticagrelor sobre la generación de trombina. A indica tiempo de retraso, B indica ETP, C indica pico, D indica tiempo hasta pico y E indica MáxR.

15 **Descripción de las realizaciones**

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir la generación de trombina que comprende una etapa para añadir un anticoagulante, un inhibidor del receptor P2Y₁₂, ADP y TF a un PRP, una etapa para añadir, además, una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al PRP y una etapa para medir la fluorescencia, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 El PRP usado en la presente invención no está especialmente limitado, siempre que sea el PRP de un mamífero. Preferentemente es PRP humano. Dicho PRP puede obtenerse extrayendo sangre de un mamífero usando una jeringa llena de, por ejemplo, citrato de sodio, EDTA o similares, y preferentemente de citrato de sodio, y a continuación sometiendo la sangre obtenida a centrifugación para obtener un sobrenadante.

25 El anticoagulante usado en la presente invención no está especialmente limitado. Los ejemplos del anticoagulante incluyen Dabigatrán, Argatrobán, Hirudina, Heparina, Enoxaparina, Dalteparina, Warfarina, Fondaparinux, Edoxabán, Rivaroxabán, Apixabán, Betrixabán, Otamixabán, sus sales y sus metabolitos activos.

30 El inhibidor del receptor P2Y₁₂ usado en la presente invención es un agente que se une a la clase P2Y₁₂ de un receptor de ADP en una plaqueta e impide la activación y/o agregación plaquetaria. El inhibidor del receptor P2Y₁₂ no está especialmente limitado. Los ejemplos del inhibidor del receptor P2Y₁₂ incluyen Ticlopidina, Clopidogrel, Prasugrel, Elinogrel, Ticagrelor, Cangrelor, sus sales y sus metabolitos activos.

35 En la presente descripción, "sal" significa una sal formada permitiendo que una base libre de un anticoagulante o un inhibidor del receptor P2Y₁₂ reaccione con un ácido o una base. En la presente descripción, "metabolito activo" significa un compuesto que muestra una acción anticoagulante o acción antiplaquetaria, que se forma como resultado de la estructura química de un anticoagulante o un inhibidor del receptor P2Y₁₂ administrado a un cuerpo vivo que se ha modificado por metabolismo enzimático o químico en el cuerpo vivo.

La concentración final del ADP usado en la etapa (a) en la presente invención es de 5 a 20 µM, y preferentemente de 10 µM.

40 El TF usado en la presente invención puede ser o un factor tisular recombinante o un factor tisular no recombinante. Preferentemente es un factor tisular recombinante y, más preferentemente, un factor tisular humano recombinante. Dicho TF puede adquirirse en, por ejemplo, Thrombinoscope BV, Dade Behring, etc. La concentración final de TF usada en la etapa (a) es de 0,05 a 0,25 pM, y preferentemente de 0,25 pM.

En la presente invención, el orden de la adición de un anticoagulante, un inhibidor del receptor P2Y₁₂, ADP y TF a una PRP no está especialmente limitado. Preferentemente, el orden es añadir un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂, y, a continuación, añadir ADP y TF.

45 La solución que contiene calcio usada en la presente invención es, preferentemente, una solución que contiene cloruro de calcio. El sustrato de trombina fluorogénico usado en la presente invención no está especialmente limitado, siempre que esté degradado por la trombina y emita fluorescencia. Un ejemplo de tal sustrato de trombina fluorogénico es Z-Gly-Gly-Arg-AMC•HCl vendido por Bachem. Como sonda fluorogénica, se usa 7-amido-4-metil-cumarina (AMC) o similares. La AMC se excita a 390 nm y se libera a 460 nm.

50 Como se ha descrito anteriormente, la solución que contiene calcio y el sustrato de trombina fluorogénico pueden adquirirse por separado. De lo contrario, también puede usarse FluCa-kit (fabricado por Thrombinoscope BV) que comprende los dos componentes anteriores.

55 En la presente invención, con el fin de medir la concentración de la trombina generada, se mide la intensidad de fluorescencia. La razón por la que se mide la intensidad de fluorescencia en lugar de medir directamente la concentración de trombina es la siguiente. El sustrato de trombina fluorogénico deja una sonda fluorogénica como resultado de la degradación por la trombina. Puesto que la intensidad de fluorescencia de la sonda fluorogénica así

liberada depende de la concentración de trombina, la concentración de trombina puede determinarse indirectamente midiendo la intensidad de fluorescencia.

5 Con el fin de convertir la intensidad de fluorescencia en una concentración de trombina, es preferible que se prepare previamente una curva de calibración. Como alternativa, usando Thrombin Calibrator, FluCa-kit y el software Thrombinoscope, que está disponible en Thrombinoscope BV, la intensidad de fluorescencia puede convertirse fácilmente en una concentración de trombina.

10 El procedimiento para medir la intensidad de fluorescencia es, por ejemplo, un procedimiento para medir la intensidad de fluorescencia usando un fluorofotómetro (Fluoskan Ascent, fabricado por Thermo Scientific). Además, con el fin de convertir la intensidad de fluorescencia que se ha medido a lo largo del tiempo en una concentración de trombina, se usa preferentemente el software Thrombinoscope fabricado por Thrombinoscope BV.

15 Los parámetros usados para evaluar la generación de trombina incluyen "tiempo de retraso (min)" que indica el tiempo que transcurre antes de la iniciación de la generación de trombina, "tiempo hasta pico (min)" que indica el tiempo que tarda la concentración de trombina en alcanzar el máximo, "ETP (nM × min)" que indica el área bajo la curva de concentración de trombina, "Pico (nM)" que indica el valor máximo de la concentración de trombina, y "MáxR (nM/min)" que indica la velocidad máxima de generación de trombina. MáxR puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula.

[Expresión 1]

$$\text{MáxR} = \frac{\text{Pico}}{\text{Tiempo hasta pico} - \text{Tiempo de retraso}}$$

20 La trombina es una enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina soluble y activa el factor XIII. La fibrina soluble se convierte en fibrina insoluble por el factor XIIIa. En consecuencia, si puede evitarse la generación de trombina, también puede evitarse la producción de fibrina insoluble. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el efecto antitrombótico obtenido cuando se usan en combinación un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂ puede determinarse en un solo sistema de ensayo.

25 Con el fin de determinar el efecto antitrombótico obtenido cuando se usan en combinación un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂, puede aplicarse el procedimiento descrito anteriormente para medir la generación de trombina. Por ejemplo, el efecto antitrombótico puede evaluarse realizando las siguientes etapas:

- (a2) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;
- (b2) una etapa para añadir difosfato de adenosina y factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido; en el que la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (b2) es de 5 a 20 μM; y la concentración final del factor tisular en la etapa (a) es de 0,05 a 0,25 μM;
- (c2) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo;
- (d2) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia;
- (e2) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante o un inhibidor del receptor P2Y₁₂, o al que no se ha administrado ninguno de los agentes;
- (f2) una etapa para añadir difosfato de adenosina y factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido; en el que la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (f2) es de 5 a 20 μM; y la concentración final del factor tisular en la etapa (f2) es de 0,05 a 0,25 μM;
- (g2) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo;
- (h2) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia; y
- (i2) una etapa para comparar el valor obtenido en la etapa (d2) con el valor obtenido en la etapa (h2).

45 Cuando el valor obtenido en la etapa (d2) se compara con el valor obtenido en la etapa (h2), la intensidad de fluorescencia se convierte en una concentración de trombina usando el software Thrombinoscope o similar, y, a continuación, se hace una comparación en términos de cada uno de tiempo de retraso (min), tiempo hasta pico (min), ETP (nM × min), pico (nM) y MáxR (nM/min). Si hay una diferencia significativa en al menos un parámetro, puede determinarse que hay efectos combinados. Si los efectos combinados son efectos aditivos o efectos sinérgicos se determina desde varios puntos de vista.

50 Puesto que tanto el anticoagulante como el inhibidor del receptor P2Y₁₂ son agentes para evitar la formación de trombos, puede producirse una hemorragia después de la administración de estos agentes. La presente invención también puede utilizarse para predecir dicho riesgo de hemorragia usando el tiempo de retraso (min), tiempo hasta

pico (min), ETP (nM × min), pico (nM) y MáxR (nM/min).

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle en los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

5 (Preparación del tampón HEPES)

El HEPES y el cloruro de sodio se disolvieron en agua destilada, de manera que los dos reactivos tenían concentraciones de 20 mM y 140 mM, respectivamente, y, a continuación, usando una solución de hidróxido de sodio de 1 mol/L, el pH de la solución se ajustó a pH 7,4. La solución así obtenida se conservó a 4 °C. Después se añadió albúmina de suero bovino (BSA) (concentración final: 0,5 %) a la solución.

10 (Preparación de la solución de ADP)

Se disolvió ADP en un tampón HEPES con BSA añadido hasta una concentración de 10 mM y, a continuación, la solución obtenida se conservó a -30 °C. Después se descongeló y, a continuación, se diluyó con un tampón HEPES con BSA añadido hasta una concentración adecuada.

(Preparación de la solución de TF)

15 Se disolvió un vial de reactivo de PRP (fabricado por Thrombinoscope BV) en 1 mL de agua destilada (concentración de TF: 6 pM). La solución obtenida se diluyó con un tampón HEPES al que no se había añadido BSA y, a continuación, se usó.

(Preparación de la solución de Edoxabán)

20 Se disolvió hidrato tosilato de Edoxabán en dimetil sulfóxido (DMSO) y, a continuación, la solución obtenida se diluyó con solución salina hasta una concentración de DMSO del 1 %.

(Preparación de la solución de Clopidogrel)

Se disolvió un metabolito activo de Clopidogrel (2-{1-[(1S)-1-(2-clorofenil)-2-metoxi-2-oxoetil]-4-sulfanil-3-dieno piperidinil} ácido acético, Thromb Haemost 2000; 84:891-6) en metanol y, a continuación, la solución obtenida se diluyó con solución salina hasta una concentración de metanol del 5 %.

25 (Preparación de la solución de Ticagrelor)

El Ticagrelor se disolvió en DMSO.

(Preparación de PRP humano)

30 Se extrajeron 18 mL de sangre de la vena radial de un voluntario sano usando una jeringa llena de 2 mL de una solución que contenía 38 mg/mL de citrato de sodio. La sangre obtenida se centrifugó a temperatura ambiente a 150 x g durante 10 minutos, de manera que se obtuvo un sobrenadante como PRP. El residuo obtenido después de la separación del PRP se centrifugó a temperatura ambiente a 2000 x g durante 10 minutos, de manera que se obtuvo un sobrenadante como plasma pobre en plaquetas (en lo sucesivo, también denominado "PPP"). El PRP se diluyó con el PPP, de manera que el número de plaquetas en el PRP podría ser de 2×10^5 plaquetas/ μ L. El PRP obtenido se dejó a 16 °C durante 30 minutos o más y, a continuación, se usó para medir la generación de trombina.

35 (Estudios relativos a las condiciones de medición)

40 Se añadieron 10 μ L de una solución salina que contenía DMSO al 1 % a una placa de 96 pocillos y, a continuación, se añadieron a la misma 70 μ L del PRP humano obtenido anteriormente. Posteriormente, se añadieron a la placa 20 μ L de una solución de ADP (concentración final: 5, 10 o 20 μ M), o 20 μ L de una solución preparada mezclando una solución de ADP (concentración final: 10 μ M) y una solución de TF (concentración final: 0,05 o 0,25 pM) en volúmenes iguales, y, a continuación, la mezcla obtenida se incubó a 37 °C.

A un pocillo usado para la curva de calibración de la concentración de trombina, se añadieron 20 μ L de calibrador de trombina (fabricado por Thrombinoscope BV), en lugar de añadir una solución de ADP o una solución de TF.

45 De cinco a siete minutos más tarde, se añadieron 20 μ L del líquido FluCa-kit calentado (fabricado por Thrombinoscope BV) al pocillo, de manera que se inició la reacción. Usando un fluorofotómetro (Fluoroskan Ascent, fabricado por Thermo Scientific), se midió la intensidad de fluorescencia en ex 390 nm/em 460 nm a 37 °C durante 150 minutos, y usando el software Thrombinoscope (fabricado por Thrombinoscope BV), se calcularon el tiempo de retraso (min), tiempo hasta pico (min), ETP (nM x min), pico (nM) y MáxR (nM/min). La medición se realizó en mediciones por triplicado.

El curso temporal de la concentración de trombina se muestra en la figura 1. Se descubrió que el ADP provoca la

generación de trombina. Además, también se descubrió que la concentración de ADP tiene una influencia sobre el pico, el tiempo de retraso y el tiempo hasta pico.

5 Como se muestra en la figura 2, cuando solo se usó ADP, no pudieron obtenerse resultados estables en las mediciones por triplicado. Por otro lado, cuando se usaron ADP y TF, se obtuvieron resultados más estables que los del uso único de ADP en las mediciones por triplicado. A medida que aumentaba la concentración de TF, se obtuvieron resultados mucho más estables.

Los parámetros individuales de la generación de trombina, que se habían obtenido cuando la concentración de ADP había sido de 10 μM y la concentración de TF había sido de 0,25 μM , se usaron como controles en los siguientes ejemplos.

10 **(Ejemplo 1: confirmación de los efectos combinados de los agentes antitrombóticos 1)**

15 Se añadieron una solución de Edoxabán y/o una solución de Clopidogrel (de 5 μL cada una) a una placa de 96 pocillos, de manera que las concentraciones de Edoxabán y Clopidogrel en PRP podrían ser los valores mostrados en la tabla 1, y también se añadieron 70 μL de PRP humano a la placa. Además, se añadieron a la placa 20 μL de una solución preparada mezclando una solución de 120 μM de ADP (concentración final: 10 μM) y una solución de 3 μM de TF (concentración final: 0,25 μM) en volúmenes iguales, y, a continuación, la mezcla obtenida se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, los parámetros individuales se calcularon de la misma manera que en los anteriores "Estudios relativos a las condiciones de medición".

[Tabla 1]

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Hidrato tosilato de Edoxabán (ng/mL)	40	80	-	-	40	40	80	80
Metabolito activo de Clopidogrel ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	10	20	10	20	10	20

20 El curso temporal de la concentración de trombina se muestra en las figuras 3A a 3D. Se descubrió que tanto el Edoxabán como el metabolito activo de Clopidogrel evitan la generación de trombina cuando los agentes se usan solos en comparación con los controles. También se descubrió que los efectos supresores pueden mejorarse aún más usando estos agentes en combinación.

25 Los valores de los parámetros individuales se muestran en la figura 4. Usando una prueba t pareada, un análisis de varianza bidireccional o una prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman, se realizaron comparaciones en los parámetros obtenidos. Al realizar los análisis estadísticos, todos los análisis se llevaron a cabo mediante pruebas bilaterales, y el nivel de significancia se estableció en menos del 5 %. Los resultados de los análisis estadísticos se muestran en la tabla 2. En la tabla, E40 indica 40 ng/mL de Edoxabán, E80 indica 80 ng/mL de Edoxabán, C10 indica un metabolito activo de Clopidogrel (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C20 indica un metabolito activo de Clopidogrel (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Cx/Ey indica el uso combinado de un metabolito activo de Clopidogrel (x $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Edoxabán (y ng/mL), respectivamente.

30

[Tabla 2]

N.º Grupo de comparación	Procedimiento de análisis	Tiempo de retraso	ETP	Pico	Tiempo hasta pico	MáxR
1	C10/E40 vs C10 Prueba t pareada	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05
	C10/E40 vs E40	<0,05	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	C20/E40 vs C20 Prueba t pareada	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	<0,0001
	C20/E40 vs E40	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
3	C10/E80 vs C10 Prueba t pareada	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05
	C10/E80 vs E80	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4	C20/E80 vs C20 Prueba t pareada	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	C20/E80 vs E80	<0,05	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5	Control vs C10 Prueba t pareada	<0,05	1,119	<0,05	<0,0001	<0,0001
	Control vs C20	<0,05	0,424	<0,0001	<0,0001	<0,0001
6	Todos los grupos Análisis de varianza bidireccional	0,2829	<0,0001	0,0583	<0,05	<0,0001
7	C10 vs C10/E40 Prueba t pareada	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05
	C10 vs C10/E80	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05
8	C20 vs C20/E40 Prueba t pareada	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	<0,0001
	C20 vs C20/E80	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
9	C10, C10/E40, C10/E80 Prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
10	C20, C20/E40, C20/E80 Prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
11	Control vs E40 Prueba t pareada	<0,0001	0,2278	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Control vs E80	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
12	Control, E40, E80 Prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Se descubrió que Edoxabán muestra un efecto dependiente de la concentración y significativo sobre tiempo de retraso, pico, tiempo hasta pico, y MáxR, en el sentido de evitar la generación de trombina (números 11 y 12). Se descubrió que el metabolito activo de Clopidogrel evita de manera significativa la generación de trombina, en términos de tiempo de retraso, pico, tiempo hasta pico y MáxR (n.º 5). Cuando se comparó un grupo de uso combinado de Edoxabán y el metabolito activo de Clopidogrel con un grupo de uso exclusivo de Edoxabán o el metabolito activo de Clopidogrel, se descubrió una diferencia significativa en todos los parámetros (números 1 a 4). También se descubrió que los efectos combinados dependen de la concentración de Edoxabán (números 9 y 10). Además, como resultado del análisis de varianza bidireccional (n.º 6), se descubrió una diferencia significativa en ETP y tiempo hasta pico, y por lo tanto, también se descubrió que se obtiene un efecto supresor más potente en la generación de trombina cuando Edoxabán se usaba en combinación con el metabolito de Clopidogrel.

(Ejemplo 2: confirmación de los efectos combinados de los agentes antitrombóticos 2)

Se añadió 1/200 de volumen de una solución de Ticagrelor al PRP humano y, a continuación, la mezcla obtenida se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 75 µL de PRP que contenía Ticagrelor a una placa de 96 pocillos, y, a continuación, se añadieron 5 µL de solución de Edoxabán a la misma. Además, se añadieron a la placa 20 µL de una solución preparada mezclando 120 µM de ADP (concentración final: 10 µM) y 3 pM de TF (concentración final: 0,25 pM) en volúmenes iguales, y, a continuación, la mezcla obtenida se incubó a 37 °C.

Se añadió una solución de Edoxabán a la placa de 96 pocillos, de manera que las concentraciones de los compuestos podrían ser del valor mostrado en la tabla 3, y posteriormente, se añadieron 70 µL de PRP humano a la misma. Además, se añadieron a la placa 20 µL de una solución preparada mezclando una solución de ADP de 120 µM (concentración final: 10 µM) y una solución de TF de 3 pM (concentración final: 0,25 µM) en volúmenes iguales, y, a continuación, la mezcla obtenida se incubó a 37 °C.

Posteriormente, los parámetros individuales se calcularon de la misma manera que en los “Estudios relativos a las condiciones de medición” anteriores.

[Tabla 3]

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Hidrato tosilato de Edoxabán (ng/mL)	40	80	-	40	80
Ticagrelor (µg/mL)	-	-	3	3	3

El curso temporal de la concentración de trombina se muestra en las figuras 5A y 5B. Se descubrió que tanto el Edoxabán como el Ticagrelor evitan la generación de trombina cuando los agentes se usan solos en comparación con los controles. También se descubrió que los efectos supresores pueden mejorar aún más usando estos agentes en combinación.

Los valores de los parámetros individuales se muestran en la figura 6. Usando una prueba t pareada, un análisis de varianza bidireccional o una prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman, se realizaron comparaciones en los parámetros obtenidos. Al realizar los análisis estadísticos, todos los análisis se llevaron a cabo mediante pruebas bilaterales, y el nivel de significancia se estableció en menos del 5 %. Los resultados de los análisis estadísticos se muestran en la tabla 4. En la tabla, E40 indica 40 ng/mL de Edoxabán, E80 indica 80 ng/mL de Edoxabán, T3 indica 3 µg/mL de Ticagrelor y T3/Ey indica el uso combinado de Ticagrelor (µg/mL) y Edoxabán (y ng/mL), respectivamente.

[Tabla 4]

N.º	Grupo de comparación	Procedimiento de análisis	Tiempo de retraso	ETP	Pico	Tiempo hasta pico	MáxR
1	T3/E40 vs T3 T3/E40 vs E40 T3/E80 vs T3 T3/E80 vs E80	Prueba t pareada	<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,05
			0,0650	<0,05	<0,05	<0,0001	<0,0001
			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
			0,5308	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001
3	Control vs T3	Prueba t pareada	0,5721	<0,05	<0,05	<0,05	
4	Todos los grupos	Análisis de varianza bidireccional	0,6703	<0,05	0,7145	0,1643	0,2561
5	T3 vs T3/E40 T3 vs T3/E80	Prueba t pareada	<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,05
			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
6	T3, T3/E40, T3/E80	Prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
7	Control vs E40 Control vs E80	Prueba t pareada	<0,0001	0,6824	<0,0001	<0,0001	<0,0001
			<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001
8	Control, E40, E80	Prueba de hipótesis de coeficiente de correlación por rangos de Spearman	<0,0001	0,1044	<0,0001	<0,0001	<0,0001

- La concentración de Edoxabán evitó en función de su concentración y de manera significativa la generación de trombina, en términos de tiempo de retraso, pico, tiempo hasta pico, y MáxR (números 7 y 8). Se descubrió que el Ticagrelor evita de manera significativa la generación de trombina, en términos de pico, tiempo hasta pico y MáxR (n.º 3). Cuando se comparó un grupo de uso combinado de Edoxabán y Ticagrelor con un grupo de uso exclusivo de Edoxabán o Ticagrelor, se descubrió una diferencia significativa en ETP, pico, tiempo hasta pico y MáxR (números 1 y 2). Se descubrió que los efectos combinados dependen de la concentración de Edoxabán (n.º 6). Además, como resultado del análisis de varianza bidireccional (n.º 4), se descubrió una diferencia significativa en ETP, y por lo tanto, también se descubrió que se obtiene un efecto supresor más potente en la generación de trombina cuando Edoxabán se usaba en combinación con el Ticagrelor.
- 5
- 10 A partir de los resultados anteriormente mencionados, se descubrió que, si se usa el sistema de ensayo *in vitro* de la presente invención, los efectos combinados de los agentes antitrombóticos pueden evaluarse desde diversos puntos de vista, sin usar el sistema de ensayo *in vivo*.

Aplicabilidad industrial

- 15 La presente invención puede usarse para determinar los efectos combinados, cuando se usan agentes antitrombóticos en combinación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para medir la generación de trombina que comprende:

- 5 (a) una etapa para añadir un anticoagulante, un inhibidor del receptor P2Y₁₂, difosfato de adenosina y un factor tisular a un plasma rico en plaquetas;
 (b) una etapa para añadir un sustrato de trombina fluorogénico y una solución que contiene calcio al mismo; y
 (c) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia,

en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (a) es de 5 a 20 µM; y
 la concentración final del factor tisular en la etapa (a) es de 0,05 a 0,25 pM.

10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticoagulante es un inhibidor del factor Xa.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el inhibidor del factor Xa es Edoxabán.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor del receptor P2Y₁₂ es Clopidogrel o Ticagrelor.

5. Un procedimiento *in vitro* para medir la generación de trombina que comprende:

- 15 (a1) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;
 (b1) una etapa para añadir difosfato de adenosina y un factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido;
 (c1) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo; y
 20 (d1) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia

en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (b1) es de 5 a 20 µM; y
 la concentración final del factor tisular en la etapa (b1) es de 0,05 a 0,25 pM.

25 6. Un procedimiento *in vitro* para evaluar los efectos combinados de un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂, que comprende:

- (a2) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;
 (b2) una etapa para añadir difosfato de adenosina y un factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido;
 30 (c2) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo;
 (d2) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia;
 (e2) una etapa para obtener plasma rico en plaquetas a partir de la sangre extraída de un mamífero al que se ha administrado un anticoagulante o un inhibidor del receptor P2Y₁₂, o al que no se ha administrado ninguno de los agentes;
 35 (f2) una etapa para añadir difosfato de adenosina y un factor tisular al plasma rico en plaquetas obtenido;
 (g2) una etapa para añadir adicionalmente una solución que contiene calcio y un sustrato de trombina fluorogénico al mismo;
 (h2) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia; y
 (i2) una etapa para comparar el valor obtenido en la etapa (d2) con el valor obtenido en la etapa (h2);

40 en el que

la concentración final del difosfato de adenosina en las etapas (b2) y (f2) es de 5 a 20 µM; y
 la concentración final del factor tisular en las etapas (b2) y (f2) es de 0,05 a 0,25 pM.

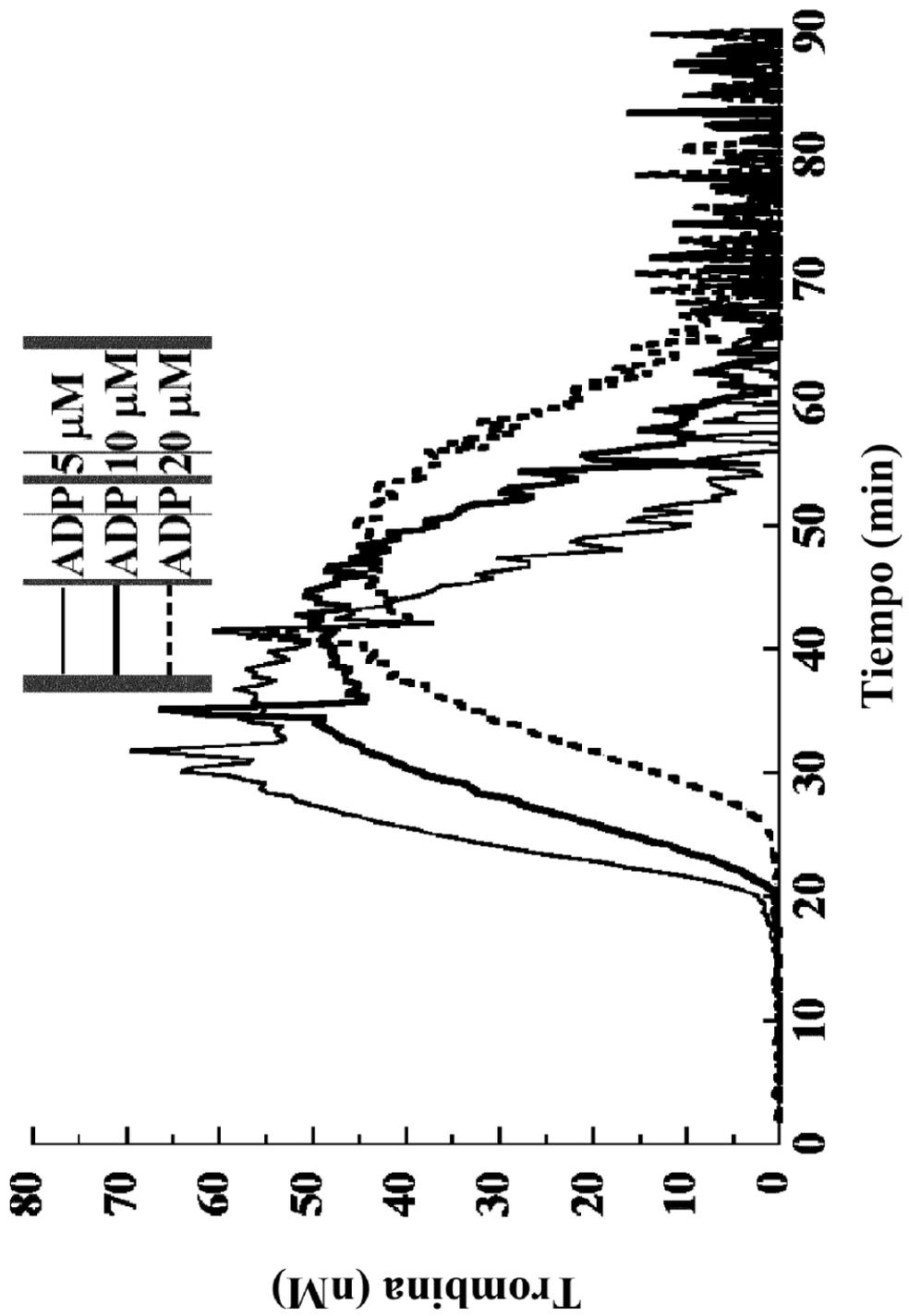
7. Un procedimiento *in vitro* para medir la generación de trombina que comprende:

- 45 (a3) una etapa para añadir difosfato de adenosina y un factor tisular al plasma rico en plaquetas que contiene un anticoagulante y un inhibidor del receptor P2Y₁₂;
 (b3) una etapa para añadir un sustrato de trombina fluorogénico y una solución que contiene calcio al mismo;
 y
 (c3) una etapa para medir la intensidad de fluorescencia

en el que

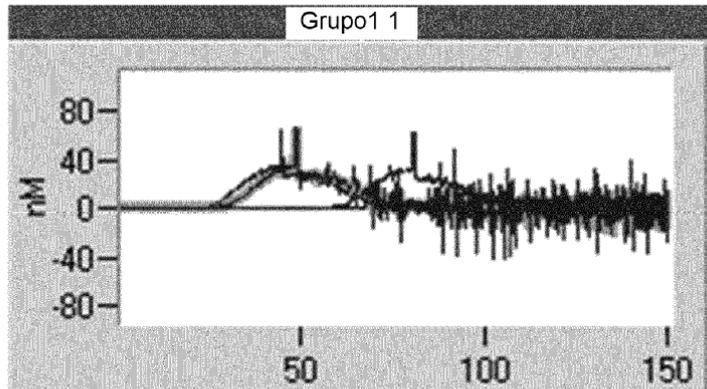
50 la concentración final del difosfato de adenosina en la etapa (a3) es de 5 a 20 µM; y
 la concentración final del factor tisular en la etapa (a3) es de 0,05 a 0,25 pM.

[Figura 1]

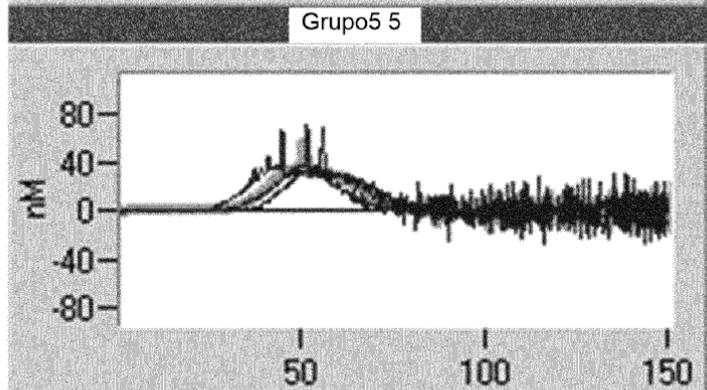


[Figura 2]

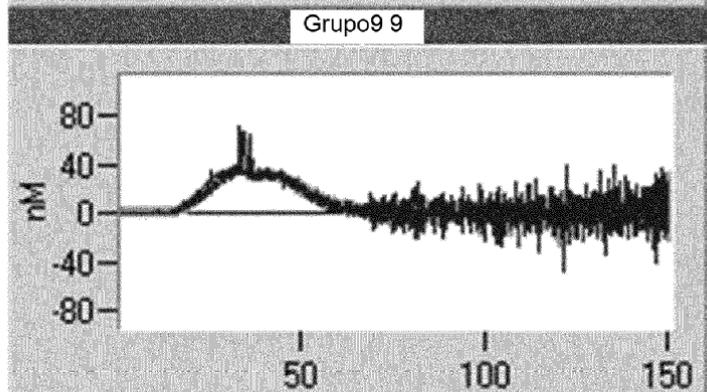
ADP 10 μM



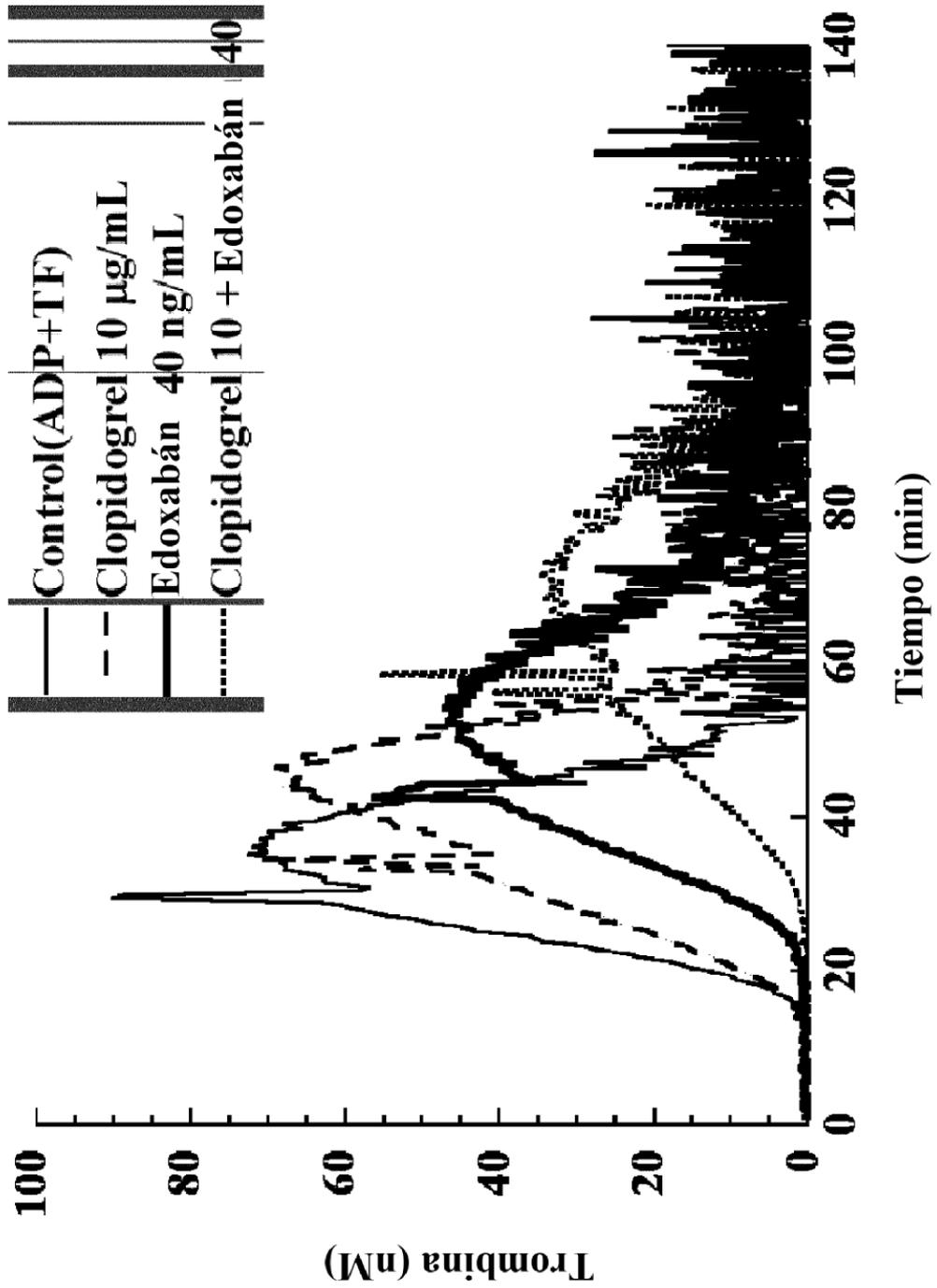
**ADP 10 μM
+
TF 0,05 pM**



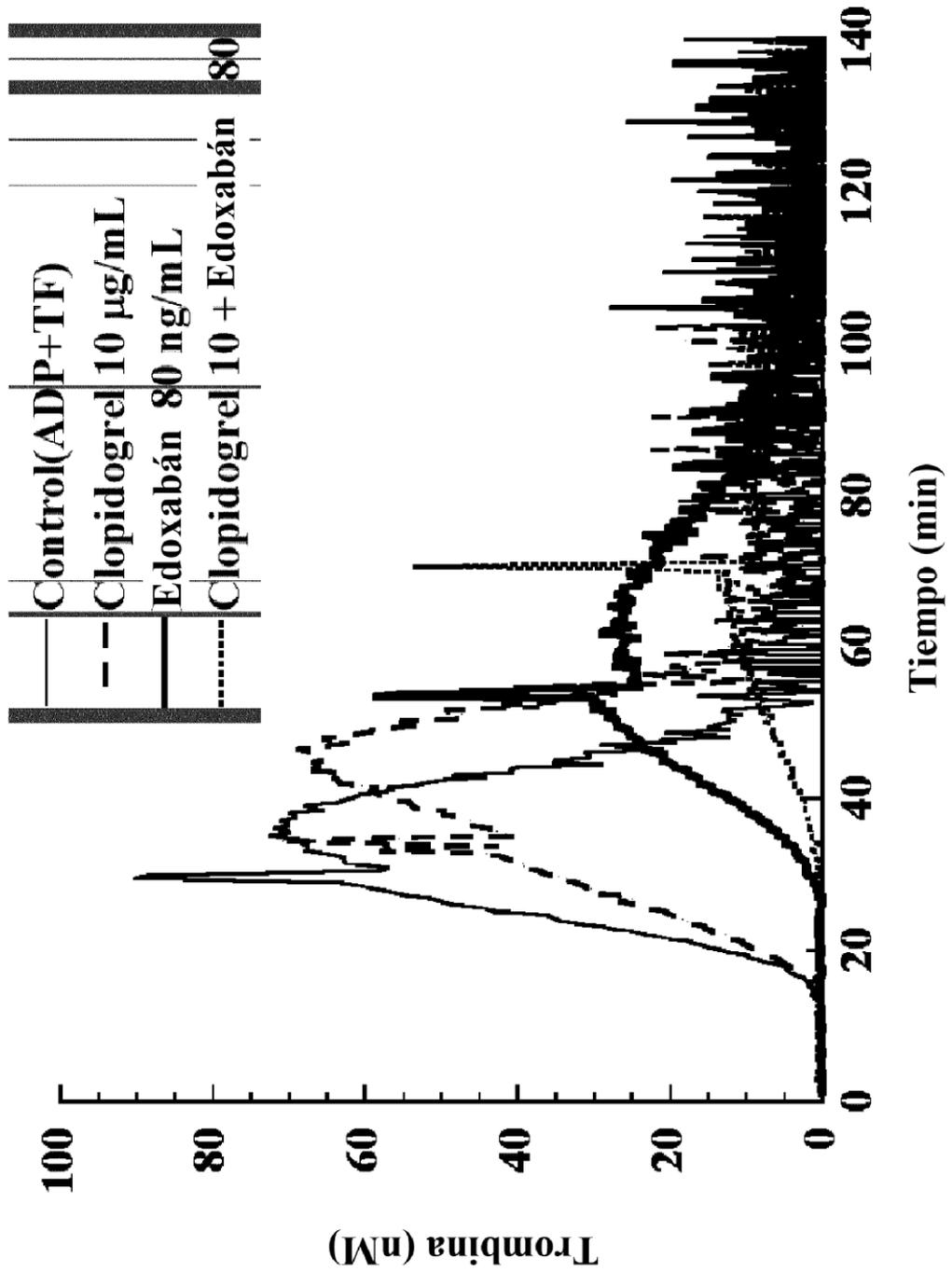
**ADP 10 μM
+
TF 0,25 pM**



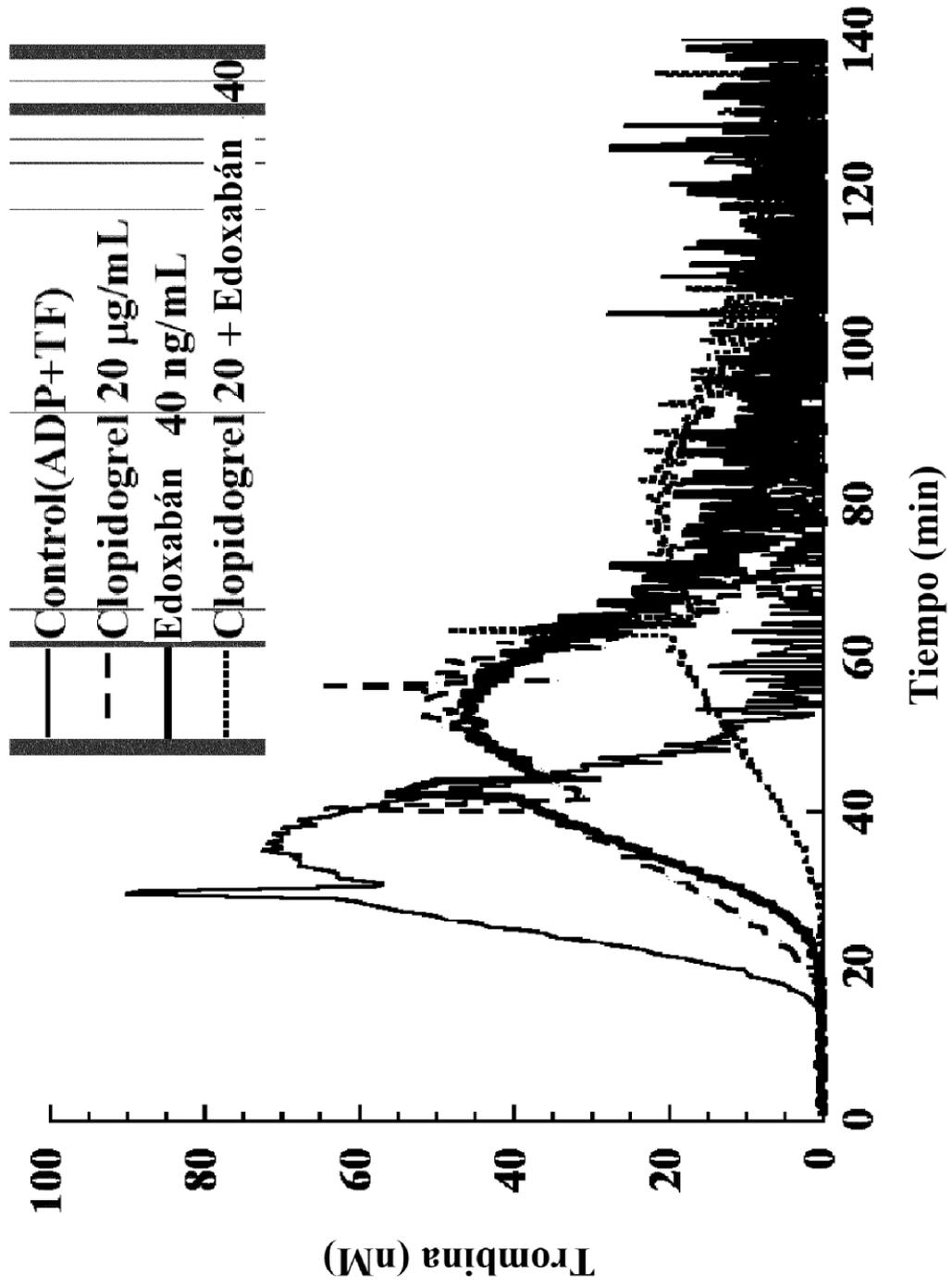
[Figura 3A]



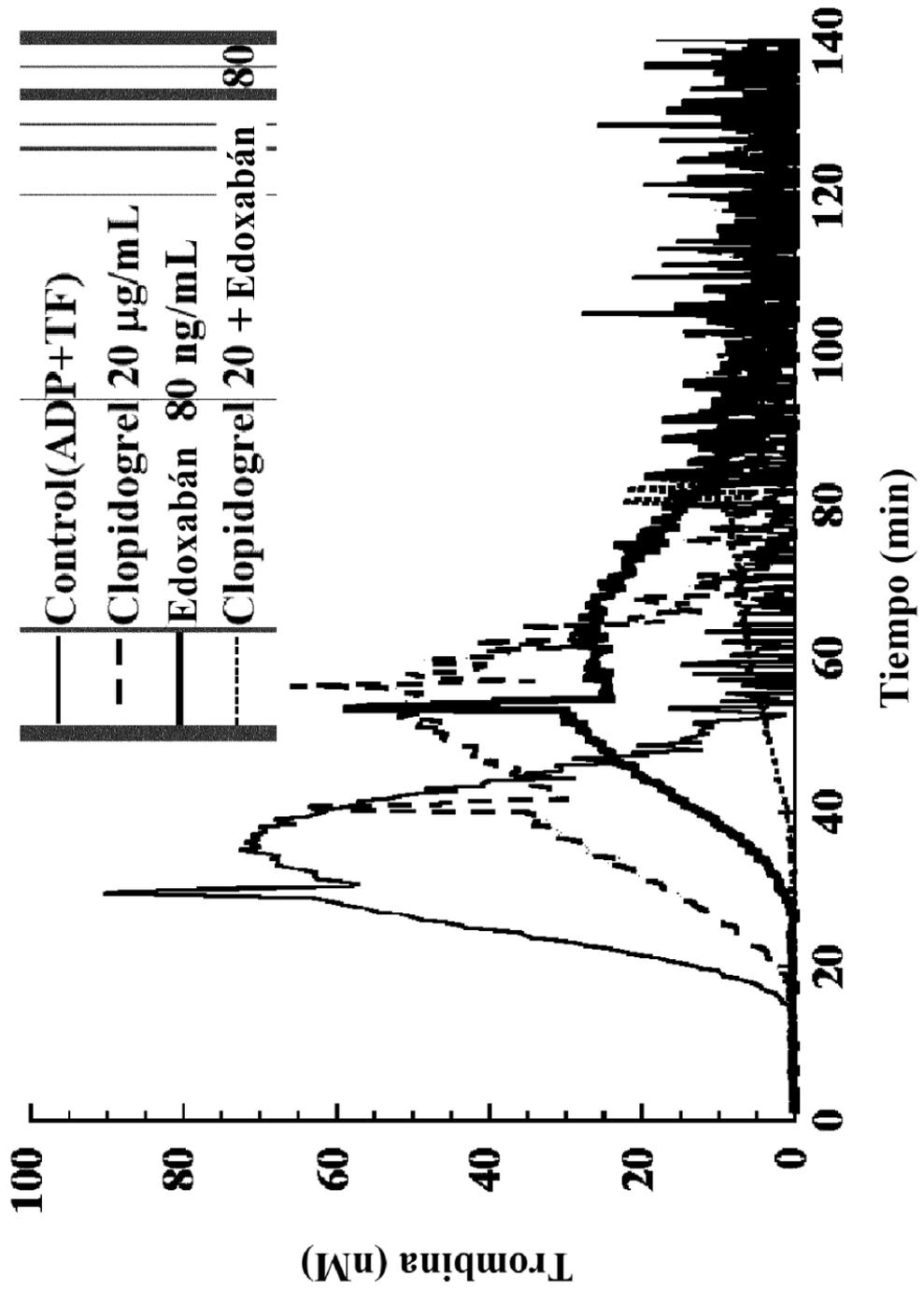
[Figura 3B]



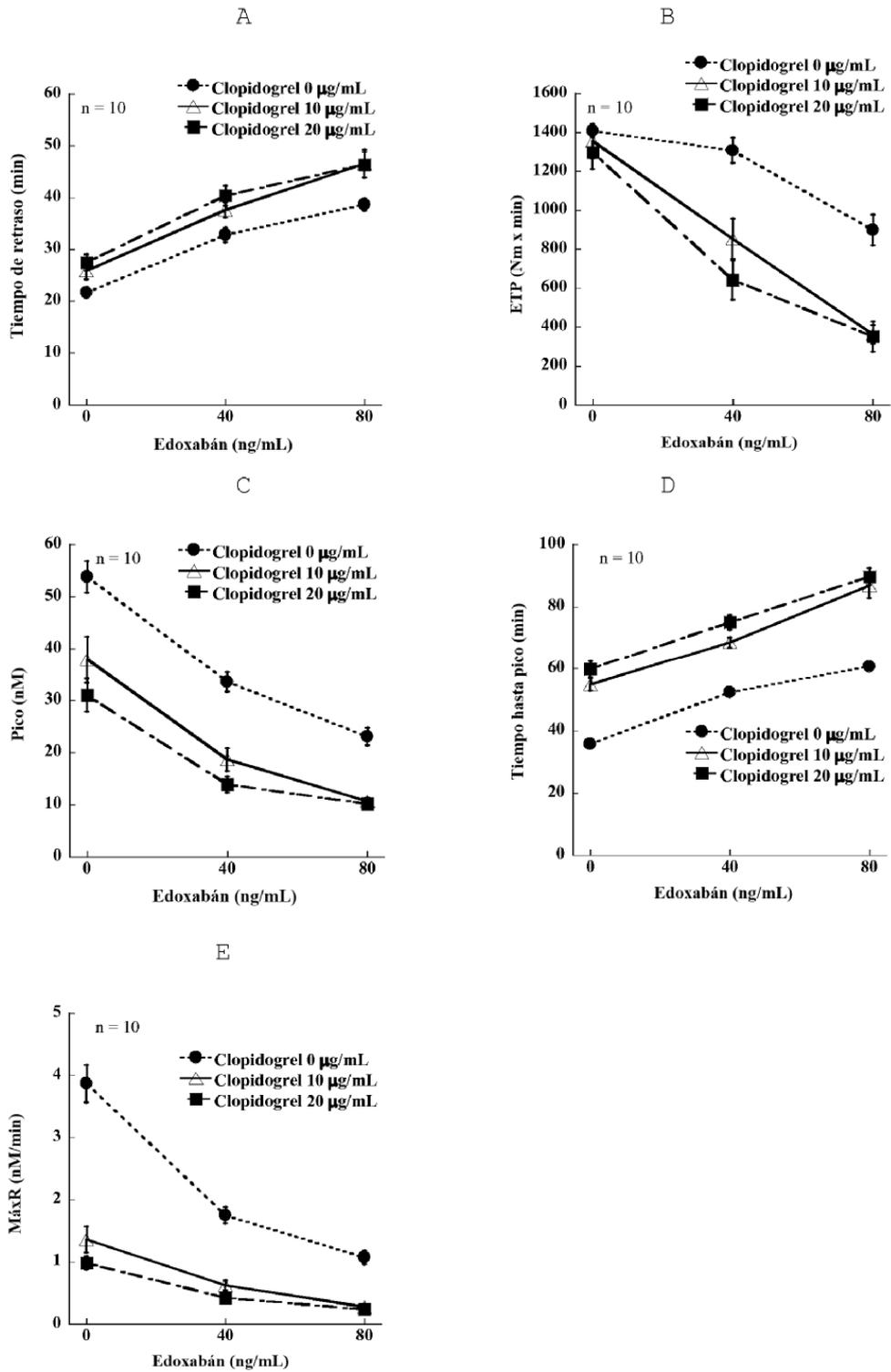
[Figura 3C]



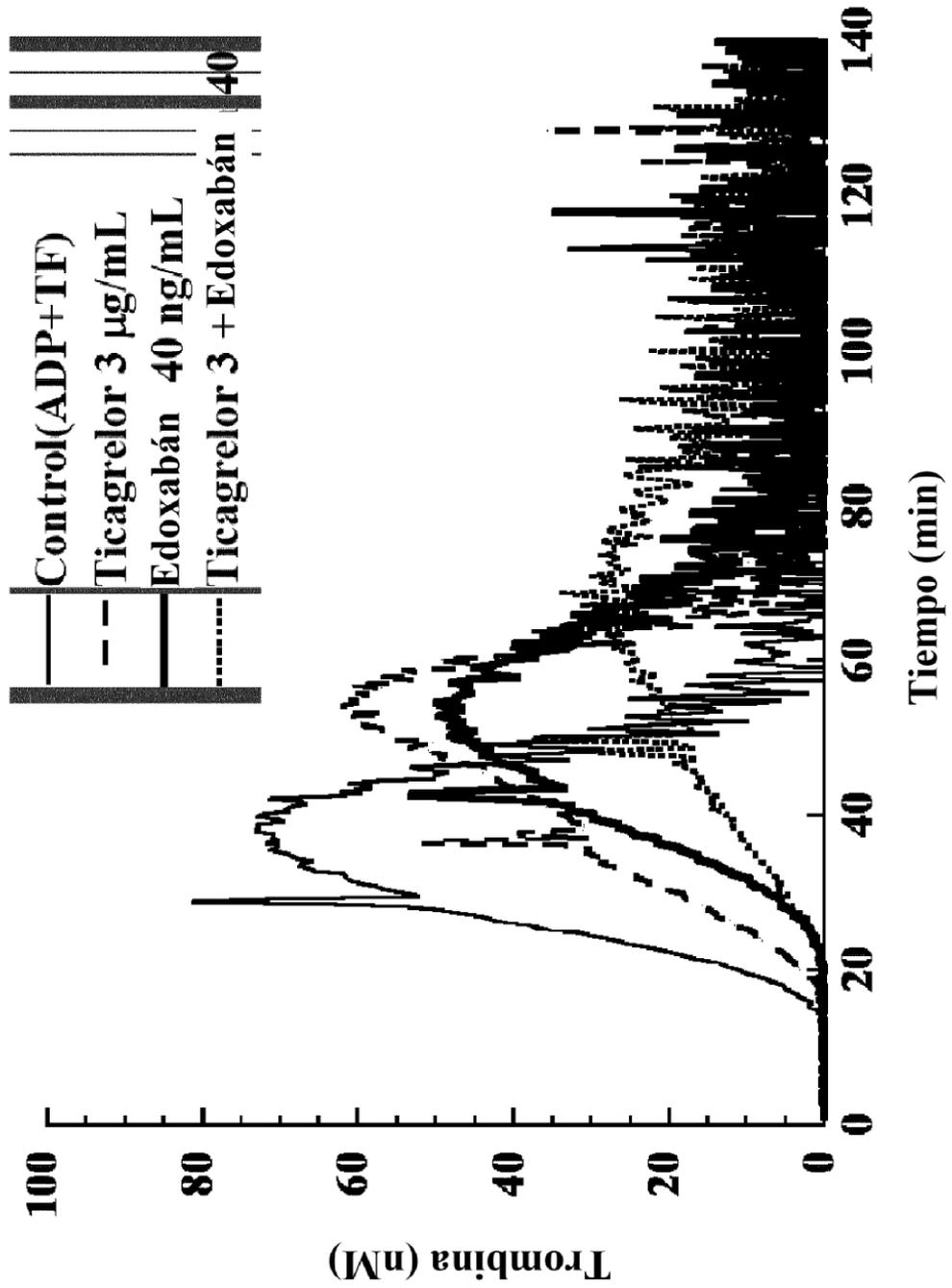
[Figura 3D]



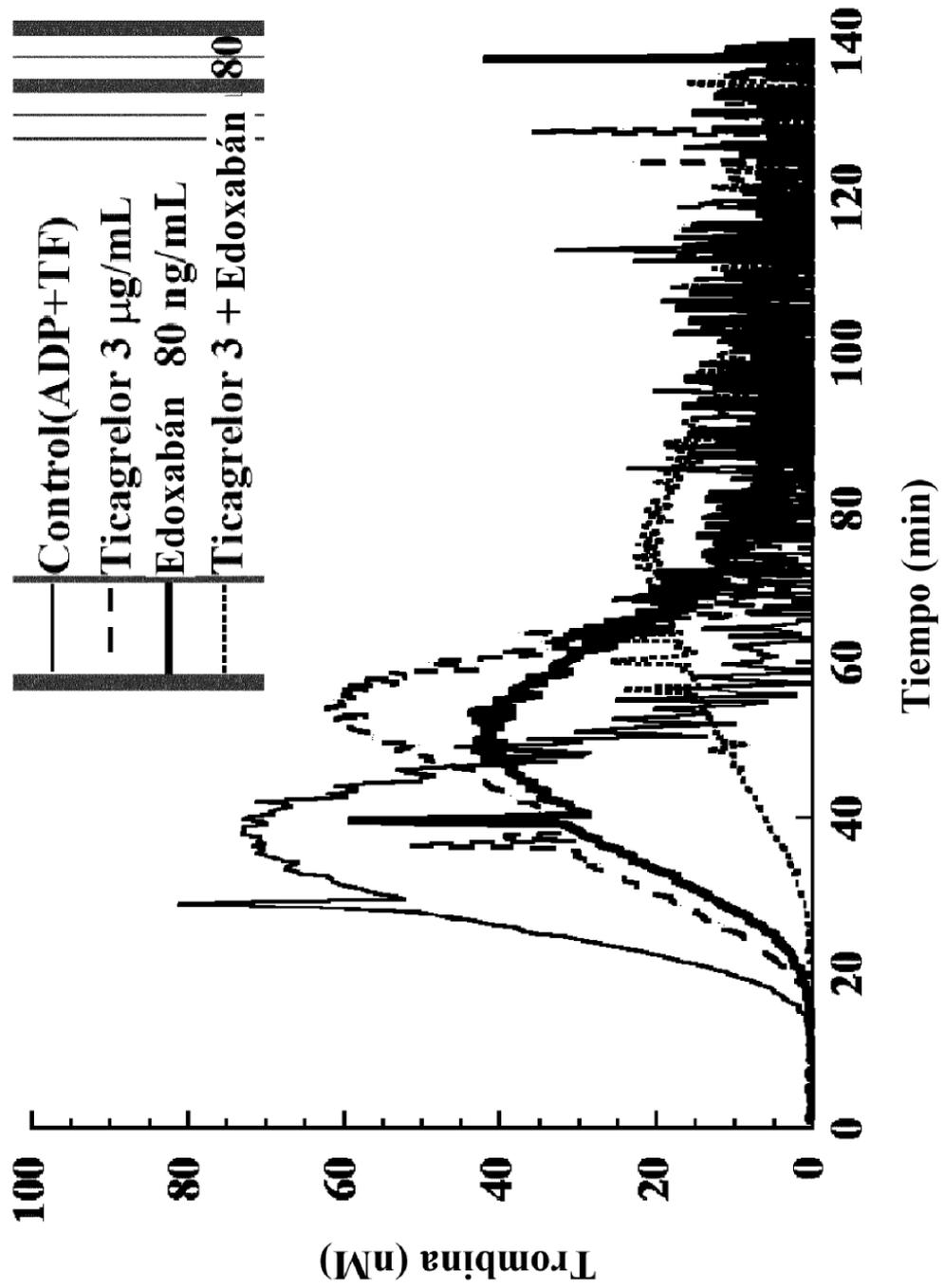
[Figura 4]



[Figura 5A]



[Figura 5B]



[Figura 6]

