



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 297 184**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03744750 .5**

(86) Fecha de presentación : **24.03.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1488232**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

(54) Título: **Procedimiento y dispositivo para la predicción de episodios cardiovasculares.**

(30) Prioridad: **24.03.2002 US 367883 P**

(73) Titular/es: **McMaster University
1280 Main Street West, GH 306G
Hamilton, Ontario L8S 4L8, CA**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(72) Inventor/es: **Yusuf, Salim;
Hirsh, Jack y
Eikelboom, John**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 297 184 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la predicción de episodios cardiovasculares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la detección rápida de la resistencia a la aspirina como indicador del riesgo de episodios cardiovasculares. Particularmente la invención se refiere a procedimientos y dispositivos para la medición de la supresión de la generación de tromboxano en respuesta al tratamiento con aspirina.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad cardiovascular se considera una causa principal de mortalidad y morbilidad y representa una pérdida significativa de recursos sanitarios en muchos países.

15 Es bien conocido que la terapia con aspirina reduce el riesgo de ictus y de un primer ataque cardíaco en individuos sanos y de ataques cardíacos posteriores, ictus o muerte cardiovascular en pacientes con enfermedad cardiovascular probada. Por ejemplo, la patente US nº 5.240.917 se refiere a la administración percutánea de la aspirina como agente antitrombótico.

20 Los estudios han demostrado que la aspirina reduce el riesgo de episodios cardiovasculares hasta un 25% en pacientes con angiopatía arterial. La mayoría de los ataques cardíacos e ictus son producidos por coágulos sanguíneos en las arterias del corazón o del cerebro que se forman en la parte superior de las placas ateroscleróticas agrietadas. Estos coágulos sanguíneos están constituidos principalmente por plaquetas fijas. La aspirina actúa para impedir la formación 25 del coágulo sanguíneo en esos puntos reduciendo la capacidad de las plaquetas para fijarse y formar agregados plaquetarios. La aspirina, conocida también como ácido acetilsalicílico, reduce la actividad de las plaquetas porque su grupo acetilo acetila una enzima intraplaquetaria clave conocida como ciclooxygenasa. Una vez acetilada, la ciclooxygenasa no puede actuar para generar tromboxano A2, sustancia liberada de las plaquetas que actúa para activar otras plaquetas y inducirlas a que se fijen en agregados. Para que actúe la aspirina, por lo tanto, deben reducirse las concentraciones 30 de tromboxano A2.

35 El tromboxano A2 presenta una vida media muy corta, y se convierte rápidamente en un metabolito estable denominado tromboxano B2. Si bien el tromboxano B2 puede determinarse en la sangre, las pruebas pueden ser problemáticas debido a que las plaquetas pueden activarse durante el proceso de recogida. Una vez activadas, las plaquetas liberarán tromboxanos que pueden interferir con el análisis. Por lo tanto resulta preferido determinar el tromboxano B2 en la orina.

40 Aun cuando las plaquetas son una parte importante de los coágulos sanguíneos, carece de una tecnología rápida para determinar y pronosticar la fisiología de las plaquetas. Algunos métodos de laboratorio aceptados incluyen:

- 45 i) Duración de la hemorragia, prueba que es cualitativa, no cuantitativa;
- ii) Agregometría plaquetaria. Esta prueba mide la fijación de las plaquetas en respuesta a varios estímulos. La prueba es laboriosa, larga y costosa y no es específica para los efectos de la aspirina en la activación de plaquetas.
- 50 iii) Pruebas de activación de plaquetas que utilizan técnicas de clasificación de células fluorescentes. La prueba puede realizarse solamente en células recién extraídas y utiliza la separación de tamaño para separar las plaquetas de otras células sanguíneas y anticuerpos activados por fluorescencia para identificar las plaquetas activadas. Esta prueba es engorrosa y no proporciona información específica para la aspirina.

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para evaluar la función de las plaquetas y correlacionar una lectura de esta función con el riesgo de un episodio cardiovascular.

55 La aspirina es eficaz para pacientes con ataques cardíacos, ictus o arteriopatía periférica o para los que presentan una situación de riesgo de estos trastornos. Asimismo se ha demostrado que la aspirina resulta eficaz para reducir la incidencia de la hipertensión provocada por el embarazo y la toxicidad antes de la fijación en las mujeres en situación de riesgo. Se ha sugerido también una función de la aspirina en la reducción del riesgo del cáncer de colon mortal y la aspirina puede ser útil en el tratamiento de pacientes con anticuerpos antifosfolípídicos, incluyendo el 60 anticoagulante del lupus. Por lo tanto, la determinación de la eficacia del tratamiento con aspirina en muchas enfermedades es un factor de pronóstico importante y puede ayudar a los médicos a recomendar el programa terapéutico más apropiado.

65 Aunque la aspirina es eficaz en muchos individuos, de aproximadamente el 10 al 20% de los pacientes con trombosis arterial que son tratados con aspirina presentan un episodio vascular recurrente durante el seguimiento de larga duración. La insuficiencia de estos pacientes para obtener como resultado un efecto beneficioso de la aspirina se denomina "resistencia a la aspirina". Existen varias explicaciones posibles para la resistencia a la aspirina pero, cualquiera que sea la causa subyacente, el resultado es el mismo. Obviamente sería beneficioso poder identificar los pacientes

resistentes a la aspirina para ayudar a los médicos a determinar la conveniencia de alterar la dosis de aspirina o administrar terapias alternativas o antiplaquetarias adicionales. Existe la necesidad por lo tanto de un procedimiento sencillo para determinar exactamente la respuesta a la aspirina y predecir la probabilidad del comienzo de un episodio cardiovascular o de otra enfermedad sanitaria lo que resultaría beneficioso a partir de la reducción de las concentraciones de tromboxano A2.

5 El documento WO 01/31052 describe un procedimiento para identificar una dosis mínima de aspirina para la inhibición de las plaquetas basado en la medición de la concentración de tromboxano B2.

10 El resumen de la solicitud de patente JP nº 62.168.803 describe un inmunoanálisis para la medición del 11-dehidro tromboxano B2.

15 REINKE M. *et al.*, en "Development of an ELISA of thromboxane B2 using a monoclonal antibody" Prostaglandins vol. 37, nº 51, 1989, páginas 577-586; HAYASHI Y. *et al.*, en "Enzyme immunoassay in thromboxane B2" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1983 NETHERLANDS, vol. 750 nº 2, 1983, págs. 322-329; describen kits para inmunoanálisis destinados a medir el tromboxano B2.

20 El "análisis 519501 de 11-dehidro tromboxano" descrito en internet y recuperado de www.cayman-chem.com en 2003, es asimismo un kit para inmunoanálisis destinado a medir el tromboxano B2.

25 **Sumario de la invención**

Resultaría de gran importancia clínica para poder identificar a las personas que están en riesgo de presentar un episodio vascular recurrente, para que puedan ser tratados de forma apropiada antes de que se produzca un ataque cardíaco o un ictus. Los intentos anteriores para desarrollar análisis de pronóstico, específicamente los que utilizan sangre, han presentados resultados diversos. Por lo tanto, un objetivo de un aspecto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento rápido, no invasivo y reproducible para determinar la resistencia a la aspirina.

30 La presente invención demuestra durante el primer momento una asociación entre la resistencia a la aspirina, definida como la insuficiencia de la supresión de la generación de tromboxano y del riesgo cardiovascular.

35 La determinación del grado de resistencia a la aspirina se utiliza para pronosticar el riesgo de un episodio cardiovascular o de otra enfermedad sanitaria lo que resultaría beneficioso a partir de la reducción de las concentraciones de tromboxano A2.

40 La presente invención se basa en la observación de que las concentraciones de metabolito urinario tromboxano A2 en pacientes son un pronóstico sorprendentemente preciso de mortalidad cardiovascular recurrente. Por lo tanto, la determinación de las concentraciones de metabolito en pacientes puede servir para identificar a los pacientes en situación de riesgo específica de desarrollar isquemia cardíaca o ictus.

45 En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para evaluar la resistencia a la aspirina en un paciente. El procedimiento comprende determinar la concentración de un metabolito de tromboxano A2 en una muestra de fluido corporal del paciente. El procedimiento comprende además preferentemente, la etapa que consiste en comparar la concentración de metabolito en la muestra con un conjunto predeterminado de cuartiles de concentración para determinar en qué cuartil está la muestra y determinar la resistencia a la aspirina basada en el cuartil de la muestra. Una concentración de metabolito dentro del segundo, tercer o cuarto cuartil es indicativo de un riesgo creciente de episodio cardiovascular.

50 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de evaluación del riesgo de un episodio cardiovascular en un paciente. El procedimiento comprende determinar la concentración de tromboxano B2 o de otro metabolito de tromboxano A2 en un fluido corporal, preferentemente la orina. En una forma de realización preferida, el procedimiento comprende un inmunoanálisis en el que una muestra de fluido corporal del paciente se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a un metabolito de tromboxano A2. Se detecta a continuación la formación de complejos inmunitarios para determinar la concentración de antígeno en la muestra y la concentración de la muestra así obtenida se compara con las concentraciones de referencia para determinar un factor de riesgo relativo.

55 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de identificación de un paciente en situación de riesgo de presentar un episodio cardiovascular que comprende poner en contacto una muestra de fluido corporal del paciente con un anticuerpo que se une específicamente con un metabolito de tromboxano A2, determinar el grado de formación de complejo inmunitario por inmunoanálisis y evaluar el riesgo de un episodio cardiovascular en el paciente basándose en la formación del complejo inmunitario.

60 En una forma de realización preferida, el paciente presenta una enfermedad vascular arterial y el procedimiento se utiliza para pronosticar el riesgo de un episodio vascular recurrente.

65 En otra forma de realización preferida, el metabolito que se determina es el tromboxano B2, preferentemente el 11-dehidro tromboxano B2.

ES 2 297 184 T3

En otro aspecto, la concentración en la orina de este metabolito superior a 15 ng/mmol de creatinina es indicativo de riesgo de episodio cardiovascular, más preferentemente una concentración en la orina de este metabolito superior a 21,9 ng/mmol de creatinina es indicativo de riesgo de episodio cardiovascular, y aún más preferentemente una concentración en la orina de este metabolito superior a 33,8 ng/mmol de creatinina es indicativo de riesgo de episodio cardiovascular.

La presente invención proporciona también un kit para evaluar la resistencia a la aspirina. El kit comprende generalmente (a) un anticuerpo que se une específicamente a un metabolito de tromboxano A2 y (b) una muestra marcada del metabolito.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de la invención para detectar 11-dehidro tromboxano B2 en una muestra de ensayo obtenida de un mamífero. El dispositivo comprende un resto inmovilizado que se une específicamente al 11-dehidro tromboxano B2 y unos medios para determinar visualmente si la concentración de 11-dehidro tromboxano excede de una cantidad umbral predeterminada. El resto que se une específicamente al 11-dehidro tromboxano B2 es preferentemente un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un antígeno que se une al dominio de un anticuerpo. El resto que se une se inmoviliza en un soporte sólido seleccionado de entre el grupo constituido por vidrio, polietileno, nilón, acetato de celulosa, nitrocelulosa y otros polímeros. El dispositivo puede estar en un formato de varilla indicadora.

Todavía en otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para pronosticar un aumento del riesgo para un episodio cardiovascular recurrente. El procedimiento comprende:

- a) medir la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 en una muestra de orina del ensayo;
- b) comparar la concentración de la muestra de ensayo con la concentración del cuartil de un conjunto de muestras de referencia;
- c) determinar en qué cuartil está la concentración de muestra de ensayo; y
- d) pronosticar el riesgo basándose en la concentración del cuartil correspondiente.

En una forma de realización particularmente preferida, se proporciona un dispositivo de inmunoanálisis para detectar la presencia de un analito. El dispositivo está compuesto por una tira que comprende un reactivo que se une específicamente al analito que se ha de analizar. El reactivo se distribuye preferentemente en parches para detectar diferentes cantidades del analito.

En otra forma de realización, se proporciona un dispositivo de inmunoanálisis que comprende dos tiras que están unidas de forma irreversible. Una tira comprende un material absorbente que puede absorber un volumen predeterminado de orina y la segunda tira comprende parches con diferentes cantidades de un resto que se une específicamente al analito que se ha de determinar.

Todavía en otra forma de realización, se proporciona un dispositivo de inmunoanálisis que comprende una primera tira que presenta un resto de anticuerpo que une específicamente el analito que debe ser determinado y una segunda tira que contiene por lo menos una concentración estandarizada del analito que debe ser determinado, en el que en el momento de la adición de una muestra de ensayo el analito compite con el analito de la segunda tira por la unión por el resto de anticuerpo.

Los procedimientos y dispositivos de la presente invención pueden identificar probablemente pacientes que son relativamente resistentes a dosis antitrombóticas de aspirina y que pueden beneficiarse de dosis mayores de aspirina o de terapias adicionales o alternativas que pueden bloquear la producción o la actividad de tromboxano o inhibir otra serie de reacciones de la activación de plaquetas.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra gráficamente la relación entre las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 y el riesgo de un episodio cardiovascular;

- 60 la Figura 2 ilustra una forma de realización de un dispositivo de ensayo según la presente invención;
- la Figura 3 ilustra el dispositivo de ensayo de la Figura 2 en asociación con una segunda tira;
- 65 la Figura 4 ilustra una forma de realización preferida de un dispositivo de ensayo de la presente invención; y
- la Figura 5 ilustra todavía otra forma de realización de un dispositivo de ensayo.

Descripción detallada

5 Los supervivientes de un infarto de miocardio agudo están en situación de riesgo muy aumentada de episodios cardiovasculares mortales y no mortales posteriores. Este riesgo elevado está influido por muchos factores, tales como la edad, las enfermedades y la respuesta al tratamiento.

10 La expresión "episodio(s) cardiovascular(es)" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a episodio(s) coronario(s) y/o cardiovascular(es) que incluyen infarto de miocardio primario, infarto de miocardio secundario, angina de pecho (que incluye la angina inestable), insuficiencia cardíaca congestiva, muerte súbita cardíaca, infarto cerebral, síncope, ataque isquémico transitorio y similares.

15 Aunque es conocido que la aspirina reduce las concentraciones de tromboxano A2, la presente invención proporciona un nuevo procedimiento para determinar la resistencia a la aspirina. El grado de resistencia a la aspirina puede determinarse para diagnosticar la aparición de un episodio cardiovascular basado en el resultado inesperado de que existe una correlación entre la concentración de la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 y la frecuencia del infarto de miocardio, ictus y muerte cardiovascular.

20 La presente invención proporciona un procedimiento para determinar el riesgo de un episodio cardiovascular recurrente basado en la concentración de tromboxano A2 producido en respuesta al tratamiento con aspirina. El nivel de generación de tromboxano A2 puede determinarse midiendo las concentraciones urinarias de metabolitos de tromboxano A2. Un metabolito de tromboxano A2 estable preferido que puede medirse es el 11-dehidro tromboxano A2.

25 En los individuos sensibles, la aspirina reduce las concentraciones de tromboxano A2 acetilando irreversiblemente la enzima, ciclooxygenasa 1. Sin embargo, una subpoblación de individuos no presenta esta inhibición de la generación de tromboxano en respuesta a la aspirina. La supresión incompleta de la generación de tromboxano con la dosis habitual (75 a 325 mg/d) de aspirina se denomina resistencia a la aspirina. En los pacientes con enfermedad cardiovascular que toman aspirina, los que son resistentes a la aspirina son los que presentan con mayor posibilidad una recurrencia de un episodio cardiovascular. La presente invención proporciona un procedimiento para identificar los pacientes que 30 son resistentes a la aspirina. Además del diagnóstico de un episodio cardiovascular, la resistencia a la aspirina puede ser un factor importante en la selección de un tratamiento para otras afecciones que se beneficiaría de una reducción de las concentraciones de tromboxano.

35 La presente invención proporciona un procedimiento de determinación de la evolución de una enfermedad asociada a la resistencia a la aspirina. Los individuos con un estado de resistencia a la aspirina superior tienden a resistir el tratamiento con la aspirina y tienden a presentar una frecuencia mayor de afecciones asociadas a concentraciones de tromboxano 2 no inhibido.

40 La presente invención proporciona un procedimiento para crear cuartiles de concentraciones de tromboxano B2 y correlacionar los niveles de cuartil con riesgo de un episodio cardiovascular. Se crearon cuatro cuartiles basados en el intervalo de niveles encontrado en los pacientes tratados con aspirina. El primer cuartil comprendía concentraciones inferiores a 15,1 ng/mmol de creatinina. El segundo cuartil comprende concentraciones comprendidas entre 15,1 y 21,8 ng/mmol de creatinina. El tercer cuartil comprende concentraciones comprendidas entre 21,9 y 33,8 ng/mmol de creatinina y el cuarto cuartil comprende concentraciones superiores a 33,8 ng/mmol de creatinina. Resulta manifiestamente evidente que estos intervalos son aproximados y que en algún estudio pueden variar los intervalos de cuartil. La razón de oportunidades para una frecuencia de un episodio cardiovascular durante un periodo de cinco años son 1,0, 1,3, 1,4 y 1,8 para el primer al cuarto cuartiles, respectivamente. Por lo tanto, el riesgo de presentar un episodio cardiovascular durante un periodo de estudio de aproximadamente 5 años es 80% mayor para los del cuarto cuartil al contrario que los del primer cuartil.

50 55 El procedimiento para evaluar el riesgo de un episodio cardiovascular comprende medir las concentraciones de tromboxano B2 en la orina y determinar en qué cuartil está la concentración. La asociación de una concentración de ensayo a un intervalo de cuartil es indicativa del riesgo a largo plazo de infarto de miocardio, ictus y muerte vascular. Las concentraciones en la orina de 11-dehidro tromboxano B2 que pronostican episodios cardiovasculares futuros son generalmente superiores a 15 ng/mmol de creatinina. Las concentraciones en la orina de 11-dehidro tromboxano que pronostican episodios cardiovasculares están comprendidas preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 15 y 100 ng/mmol de creatinina, más preferentemente entre 21 y 100 ng/mmol de creatinina y todavía más preferentemente entre 30 y 100 ng/mmol de creatinina.

60 La Figura 1 ilustra la asociación entre los cuartiles de las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 y los compuestos de infarto de miocardio (MI), ictus y muerte cardiovascular (CV) que se observó en un estudio a título de ejemplo. El estudio en el que se basan estos resultados se expone con mayor detalle en el Ejemplo 1 a continuación. Los resultados indican que si el valor del análisis se encuentra dentro del primer cuartil existe un riesgo absoluto de aproximadamente el 10%. Si el valor del análisis se encuentra dentro del segundo cuartil existe un riesgo absoluto de aproximadamente el 13% durante 5 años. Si el valor del análisis se encuentra dentro del tercer cuartil el riesgo absoluto de aproximadamente el 14% y si el valor se encuentra dentro del cuarto cuartil, el riesgo es de aproximadamente el 18%.

ES 2 297 184 T3

La presente invención proporciona un procedimiento para pronosticar la aparición de un episodio cardiovascular en un paciente, en el que un fluido corporal del paciente se somete *in vitro* a la determinación de las concentraciones en éste de un metabolito de tromboxano A2 o de un fragmento del mismo.

5 La invención proporciona asimismo un procedimiento de identificación de pacientes, en riesgo de presentar un episodio cardiovascular u otra afección que se beneficie de la reducción de las concentraciones de tromboxano A2, en el que un fluido corporal del paciente se somete *in vitro* a la determinación de las concentraciones en éste de un metabolito de tromboxano A2 o de un fragmento del mismo y se efectúa una evaluación del riesgo del paciente basándose en estas concentraciones.

10 Dicha identificación puede ser positiva, es decir, para identificar los pacientes en situación de riesgo y por consiguiente necesitados de tratamiento alternativo o negativa para eliminar a los pacientes que no están en situación de riesgo significativo en un seguimiento extenso.

15 Pueden utilizarse varios métodos para medir la concentración de metabolitos de tromboxano A2 en una muestra de fluido biológico. La concentración puede medirse seleccionando un método de entre el grupo constituido por cromatografía, inmunoanálisis, espectroscopia y otros procedimientos cuantitativos conocidos por los expertos en la materia. El método cromatográfico es preferentemente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía de gases (GC). El método espectroscópico se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido 20 por espectroscopía ultravioleta, espectroscopía infrarroja y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

25 Pueden utilizarse varios tipos de inmunoanálisis. Por ejemplo, un análisis en "sándwich" en el que el metabolito está colocado entre un anticuerpo de captura inmovilizado en un soporte sólido y un detector marcado puede utilizarse para determinar la cantidad de complejo marcado antígeno-anticuerpo. Alternativamente, puede utilizarse un inmunoanálisis de competición en el que un anticuerpo se une a un soporte que está en contacto con una cantidad desconocida de metabolito de la muestra y antígeno marcado del mismo tipo. La cantidad de antígeno marcado unido al soporte es indicativa de la cantidad de antígeno en la muestra.

30 El término "anticuerpo" se utiliza en la presente memoria para referirse a un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de anticuerpo que presenta una actividad de unión específica. La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo, tal como un dominio que se une al anticuerpo, un dominio hipervariable de una de las dos cadenas pesada y ligera y la expresión incluye también anticuerpos monocatenarios.

35 Algunos ejemplos de soportes sólidos que pueden utilizarse en la presente invención incluyen placas, tubos, bolas de poliestireno, nilón, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros tipos de polímeros porosos.

Los procedimientos de la presente invención pueden realizarse utilizando kits de inmunoanálisis. Los kits pueden ser en cuanto al diseño de varilla indicadora, flujo a través o migratorio así como otros formatos conocidos por los expertos en la materia.

40 La determinación por inmunoanálisis de metabolitos de tromboxano A2 puede realizarse utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales, que pueden producirse utilizando técnicas convencionales en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos inyectando a un animal hospedador, por ejemplo, un ratón o conejo el antígeno. El antígeno puede conjugarse con un proteína inmunógena tal como PPD, una proteína derivada de la tuberculina, hemocianina de la lapa californiana, BSA, etc., para proporcionar un suero que contiene anticuerpos policlonales o 45 esplenocitos para la fusión para proporcionar hibridomas o líneas celulares inmortalizadas. Pueden utilizarse también otros métodos habituales.

50 En una forma de realización preferida, el inmunoanálisis comprende la utilización de un anticuerpo en forma inmovilizada, por ejemplo en placas de microvaloración, membranas o bolas, para atrapar el antígeno. En un análisis en *sándwich*, el antígeno unido puede marcarse utilizando anticuerpo soluble adicional, que puede ser monoclonal o policlonal y que puede llevar un marcador o, más convenientemente, puede marcarse posteriormente por reacción con un anticuerpo secundario que lleva un marcador.

55 Los marcadores adecuados incluyen radionucleidos, fluoróforos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, enzimas, por ejemplo como las utilizadas en el sistema ELISA, colorantes o partículas tal como oro coloidal.

60 Alternativamente, puede utilizarse un análisis de unión competitiva, en el que una cantidad conocida de metabolito marcado se añade a la disolución del analito y se pone en contacto con una cantidad limitada del anticuerpo monoclonal inmovilizado, por lo que la cantidad de antígeno marcado que se inmoviliza es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno marcado presente en el analito.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la resistencia a la aspirina. El método comprende:

65 a) poner en contacto un fluido corporal con un anticuerpo reactivo con 11-dehidro tromboxano durante un periodo y en condiciones suficientes para formar un complejo antígeno-anticuerpo y detectar el complejo antígeno-anticuerpo formado;

ES 2 297 184 T3

- b) cuantificar la cantidad de complejo formado en la etapa a); y
- c) comparar la cantidad de complejo cuantificado en la etapa b) con las concentraciones habituales, en el que se correlaciona una concentración elevada de 11-dehidro tromboxano con la resistencia a la aspirina.

5

En una forma de realización preferida, el método comprende además cuantificar el grado de resistencia a la aspirina para diagnosticar el riesgo de un episodio cardiovascular.

10 En otro aspecto de la invención, los componentes que se necesitan para realizar el inmunoanálisis se suministran en forma de kit. Dicho kit comprendería:

- (a) un anticuerpo que puede unirse a 11-dehidro tromboxano A2, estando dicho anticuerpo en forma inmovilizada;
- (b) una preparación de referencia de 11-dehidro tromboxano B2; y
- (c) un anticuerpo secundario marcado específico para 11-dehidro tromboxano B2.

20

En una forma de realización preferida del procedimiento de la invención, puede obtenerse una determinación cuantitativa de las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 en la orina, en la que una concentración superior a 15 ng/mmol de creatinina es indicativa de un aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca.

25 El fluido corporal en el que se realiza la determinación puede ser cualquier fluido corporal en el que pueda localizarse 11-dehidro tromboxano. Preferentemente es la orina. En algunos casos puede ser conveniente extraer el péptido o tratar la muestra antes de la determinación.

30 Debido a que el 11-dehidro tromboxano B2 es muy estable en el almacenamiento, puede obtenerse un pronóstico fiable cuando la determinación se realiza en muestras que han sido almacenadas durante algún tiempo. Esto es ventajoso porque facilita la reproducibilidad del análisis y permite retrasar el análisis tras la toma de muestra. Otra ventaja del procedimiento consiste en que la determinación del 11-dehidro tromboxano B2 puede realizarse con gran especificidad y sensibilidad conducido así a un pronóstico preciso y fiable de los episodios cardiovasculares recurrentes. Los métodos de la técnica anterior no se aproximan a este nivel de precisión y sensibilidad.

35

35 En la Figura 2 se muestra una forma de realización preferida de un kit de análisis para la determinación de las concentraciones de 11-dehidro tromboxano. Se proporciona una tira de ensayo 10 que se divide en parches de ensayo, 12, 14, 16 y 18. Cada parche tiene un reactivo que reacciona en presencia de 11-dehidro tromboxano B2 y cada reactivo se aplica de modo que reaccione con una concentración predeterminada de 11-dehidro tromboxano B2, en un periodo de tiempo dado. En una forma de realización particularmente preferida, cada uno de dichos parches 12, 14, 16 y 18 se ajusta para que reaccione a la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 en la orina de a) menos de 15,1, b) de 15,1 a 21,8, c) 21,9 a 33,8 y d) mayor de 33,8 (expresado como ng/mol de creatinina), respectivamente. Cada parche se procesa de modo que un colorante u otro agente colorimétrico proporcione una lectura del 11-dehidro tromboxano B2 presente en la orina. Los reactivos, anticuerpos y otros medios de ensayo e indicación, así como los procedimientos de tratamiento son bien conocidos en la técnica. La tira de ensayo 10 puede incluir también un parche 20 que cambia de color cuando el parche ha estado en la orina un periodo de tiempo apropiado para obtener la reacción deseada. Los reactivos utilizados para este parche 20 reaccionarán con las sustancias en la orina que son bien conocidas en la técnica. En algunas formas de realización preferidas los parches 12, 14, 16, 18 han imprimido también en cada uno de ellos los factores de riesgo absoluto y relativo asociados con la cantidad de 11-dehidro tromboxano B2 detectada en este parche específico. Esto permitiría al médico obtener directamente el riesgo para el paciente analizado a partir de la propia tira de ensayo. Esto aceleraría el diagnóstico y evitaría errores.

55 En una forma de realización preferida representada en la Figura 3, la tira de ensayo 10 está unida floja a una segunda tira 22. La segunda tira 22 es generalmente de un material absorbente y puede absorber una cantidad predeterminada de orina. Cuando las dos tiras están en contacto entre sí, los grupos de las dos tiras pueden interactuar para producir una señal.

60 En la Figura 4 se presenta un dispositivo preferido según la presente invención. Este sistema incluye dos tiras, 30, 32 que están unidas de forma desmontable de modo que pueden sumergirse en la muestra de orina cuando están unidas, pero pueden despegarse o desprenderse en el momento adecuado cuando el usuario desee observar los resultados de las reacciones. En una forma de realización preferida de la invención, la tira 32 está realizada en un material absorbente tal como una membrana porosa de polímero de microfiltro o de un material similar concebido para absorber un volumen fijo de orina cuando las dos tiras están sumergidas en la muestra de orina. La otra tira 30 es de una membrana polimérica o de hoja de papel, por ejemplo, de nitrocelulosa o material similar. Esta membrana 65 está preferentemente impregnada o recubierta con una concentración fija de una molécula indicadora 34, tal como un colorante o una enzima que está unida a un anticuerpo o a otro biorreceptor 36 específico para el analito que debe detectarse, tal como 11-dehidro tromboxano B2. La tira 30 es de un material que no permite que la orina se absorba en ella, preferentemente un material hidrófobo, excepto que requiera contacto completo con la interfase entre la tira

30 y la tira 32, lo que permite al 11-dehidro tromboxano B2 contenido en la orina en la tira 32 entrar en contacto con el anticuerpo específico para el 11-dehidro tromboxano B2, contenido en y/o sobre la tira 30. La separación del anticuerpo marcado entre las tiras 30 y 32 puede facilitarse proporcionando, entre el anticuerpo y la tira 30, un enlace 35 físico separable de manera que conserve el reconocimiento adecuado del analito entre el anticuerpo y el 11-dehidro 5 tromboxano B2 asociado a la tira. El enlace puede realizarse utilizando la zona Fc de IgG específica que une proteínas tal como la Proteína A, la Proteína G o anticuerpos secundarios específicos para la zona Fc del anticuerpo primario, para proporcionar este enlace físico separable, lo que proporcionaría unos medios de anclaje del anticuerpo 36 a la tira 10 30. Las dos tiras después de estar sumergidas en la orina se incuban en el periodo de tiempo fijado y a continuación se separan. El anticuerpo 36 puede reconocer al analito 37 presente en la orina y migrará a la tira 32. La presente invención 15 aprovecha la afinidad entre el anticuerpo y 11-dehidro tromboxano B2 por una parte y las afinidades respectivas entre 11-dehidro tromboxano B2 y la tira 32 y entre el anticuerpo y la tira 32. En una forma de realización preferida, la sonda ligada al anticuerpo permanecerá en la tira 30 si no reacciona con 11-dehidro tromboxano B2 en la orina. Si el anticuerpo se une al 11-dehidro tromboxano B2 contenido en la orina de la tira 32 se retirará de la tira 30. Por 20 lo tanto, la cantidad de señal de la tira 30 es inversamente proporcional a la cantidad de 11-dehidro tromboxano B2 contenido en la orina cuando las dos tiras 30 y 32 se despegan. La tira comprende opcionalmente por lo menos dos, preferentemente 4, parches 38, 40 de referencia que permiten la comparación entre el nivel de la señal resultante de la reacción y la señal visual que corresponde a cada uno de los cuatro niveles de 11-dehidro tromboxano B2 (inferior a 15,1, 15,1 a 21,8, 219 a 33,7 y por último superior a 33,7 citados anteriormente). Este sistema también puede indicar los niveles de riesgo correspondientes que corresponde a las cantidades de 11-dehidro tromboxano B2 contenido en la 25 orina. Las concentraciones utilizadas para la unión competitiva pueden alterarse para proporcionar relaciones óptimas de señal a ruido.

En otra forma de realización, representada en la Figura 5, la tira 42 tiene un anticuerpo 42 marcado asociado a ella. La tira acompañante 46 puede comprender opcionalmente por lo menos dos, preferentemente cuatro, parches 48, 50 25 que contienen densidades crecientes de analito 56 sintético o natural (11-dehidro tromboxano B2) inmovilizado en la superficie. El anticuerpo marcado se disuelve en la muestra de orina en la tira 42 y comenzará a distribuirse entre el analito y la muestra 58 y el analito 56 inmovilizado en la tira 44. Es decir, existe una unión competitiva entre el analito en la orina y el analito inmovilizado. La presencia de analito en la muestra de orina impedirá la unión del anticuerpo marcado con el analito inmovilizado en los parches en función de la dosis. Este anticuerpo restante disponible será 30 detectado y cuantificado por la unión relativa a los parches de densidad creciente.

Si bien se han descrito las formas de realización preferidas que comprenden dos tiras de material, debe entenderse que estos componentes podrían ser segmentos de unas cintas o rodillos mayores. Resulta asimismo manifiestamente evidente que una lectura positiva (aumento de la intensidad de la señal) o negativa (disminución de la señal) puede 35 utilizarse en una de las dos tiras como indicador de la cantidad de analito en la muestra de ensayo.

Si bien la presente invención se ha descrito a partir de las formas de realización preferidas, la determinación del analito o la determinación simultánea de dos o más analitos (tales como el 11-dehidro tromboxano B2 y la creatinina) 40 puede también realizarse utilizando tecnologías existentes de experimentación rápida tales como, pero no limitadas a varillas indicadoras basadas en biosensores o membranas, tiras de flujo lateral o cromatográficas.

Si bien estas formas de realización han descrito un método para analizar la cantidad de 11-dehidro tromboxano B2 en una muestra analítica, debe entenderse que en otras formas de realización de la presente invención pueden medirse otros metabolitos de tromboxano A2 como indicador de resistencia a la aspirina. Resulta evidente que para la detección 45 de otros metabolitos, se sustituirán otros anticuerpos que presentan una afinidad para estos metabolitos con objeto de analizar la presencia y cantidad de estas otras proteínas.

La exposición anterior describe en general la presente invención. Puede obtenerse una mayor comprensión haciendo referencia a los ejemplos específicos siguientes. Estos ejemplos se describen únicamente a título ilustrativo y 50 no limitativo del alcance de la invención. Como circunstancias que pueden sugerirse o ser convenientes se contemplan cambios en la forma y sustitución de equivalentes. Aunque en la presente memoria se han utilizado términos específicos, dichos términos se proporcionan en sentido descriptivo y no con fines limitativos.

Como se demostrará en los ejemplos siguientes, la detección precoz de la resistencia a la aspirina es un indicador 55 importante de supervivencia general a largo plazo mejorada y de mortalidad y morbilidad reducidas debido a episodios cardiovasculares mayores. En particular, las concentraciones de 11-dehidro tromboxano superiores a 33,8 ng/mol de creatinina están asociadas a un riesgo de episodio cardiovascular superior al 80% que las concentraciones inferiores a 15,2 ng/mol de creatinina. Mediante el reconocimiento de la resistencia a la aspirina y sus implicaciones, pueden reducirse las muertes en su conjunto y puede reducirse la insuficiencia cardíaca congestiva que requiere 60 hospitalización. La detección de la resistencia a la aspirina también es importante para el desarrollo de una estrategia apropiada de tratamiento para otra afección que pueda beneficiarse de una reducción de las concentraciones de tromboxano A2.

Ejemplos

65

Los ejemplos se describen a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Diseño del estudio

- 5 El estudio HOPE¹ fue una prueba internacional de ramiprilo y vitamina E, factorial dos por dos, controlada por placebo, al azar, para la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular. El comité del estudio institucional en cada centro participante aprobó el estudio y todos los pacientes dieron su autorización explícita.

10 *Pacientes*

Un total de 9.541 pacientes de por lo menos 55 años en el momento de la distribución aleatoria que presentaban antecedentes de arteriopatía coronaria, ictus, enfermedad vascular periférica o diabetes más por lo menos otro factor de riesgo cardiovascular se asignaron a uno de cuatro tratamientos: ramiprilo valorado hasta 10 mg al día, vitamina E 15 400 UI al día, ambos o ninguno. El estudio comenzó en diciembre de 1993 y finalizó prematuramente el 22 de marzo de 1999, debido a las evidencias claras de la utilidad del ramiprilo.

20 *Toma de muestras de orina*

A todos los participantes en el estudio se les pidió que proporcionasen una muestra de la primera orina matutina en el momento de la distribución aleatoria. De los 9.541 pacientes en el estudio HOPE, 9.282 (97%) proporcionaron muestras de orina de referencia. Las muestras (n=5.529) de 129 centros canadienses que participaron en este estudio fueron enviadas al laboratorio central en Hamilton, Canadá donde se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Para el 25 presente estudio se utilizaron solamente las muestras de centros canadienses.

30 *Seguimiento y determinación de los resultados clínicos*

A todos los pacientes del estudio HOPE se les realizó un seguimiento a intervalos de un mes, seis meses y de seis veces al mes después hasta la terminación del estudio. En cada seguimiento, se registraron los resultados clínicos y se documentó la utilización de la medicación, incluyendo la aspirina. El resultado principal fue la combinación de infarto de miocardio, ictus y muerte por causas cardiovasculares.

35 *Selección de casos y referencias*

De entre los pacientes con muestras de orina disponible (n=5.529), únicamente los que estaban tomando aspirina en el momento del inicio de la fase inicial (antes de la distribución aleatoria), en la distribución aleatoria (coincidiendo 40 con el periodo de toma de muestras de orina) y en cada visita de seguimiento, fueron seleccionados para su inclusión. Los pacientes tratados con aspirina que proporcionaron una muestra de orina de referencia adecuada y presentaban un infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular confirmados después de la distribución aleatoria se definieron como casos. Las referencias fueron seleccionadas al azar de entre los pacientes tratados con aspirina que proporcionaron una 45 muestra de orina de referencia adecuada pero no experimentaron infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular tras la distribución aleatoria. Se emparejaron las referencias según el sexo y la edad (± 5 años) en una relación 1:1 con los casos.

50 *Análisis de laboratorio*

En cada caso y referencia, se descongeló la orina recogida y almacenada en la referencia y se analizaron las 55 concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 utilizando un inmunoanálisis enzimático comercializado (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) que tiene coeficientes inter- e intraanálisis de variación de 12,1% y 10%, respectivamente. Los análisis fueron realizados por personal de laboratorio a ciegas para el estado del paciente como caso o referencia. Además, las muestras de los casos y de referencias se analizaron en orden aleatorio, reduciendo de este modo la posibilidad de sesgo sistemático.

60 *Análisis estadístico*

Se calcularon las medias o proporciones para los factores demográficos y de riesgo de referencia para los casos y las referencias. El significado de cualquier diferencia entre los casos y las referencias se determinó utilizando la prueba de la t de Student para las medias y la prueba de McNemar de ji cuadrado para proporciones, que considera el emparejamiento entre casos y referencias. Debido a que los valores del 11-dehidro tromboxano B2 se presentan sesgados, las medias geométricas se calcularon tras la transformación log de los datos en bruto y la trascendencia de 65 toda diferencia en los valores de la media geométrica entre los casos y las referencias se analizó utilizando la prueba de la t de Student. Se calcularon también las concentraciones medias y las concentraciones en los casos y referencias se compararon utilizando la prueba de la suma por orden de Wilcoxon.

Se utilizaron pruebas de tendencia para evaluar cualquier asociación entre las concentraciones crecientes de 11-dehidro tromboxano B2 de referencia y el riesgo de infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular después de dividir las muestras en cuartiles definidos por la distribución de la cohorte completa. Se obtuvieron estimaciones ajustadas de la asociación entre las concentraciones crecientes de 11-dehidro tromboxano B2 de referencia y el riesgo de infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular utilizando el modelo de regresión logística condicional que tenía en cuenta las variables emparejadas y controladas por la asignación aleatoria del tratamiento y las diferencias de referencia entre los casos y las referencias. Se utilizó un modelo de regresión multivariable independiente para examinar la asociación entre las características del paciente de referencia, incluyendo la edad, el sexo, la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, el índice de masa corporal, los antecedentes de enfermedad vascular, factores de riesgo vascular convencional, terapia liporreductora, beta-bloqueantes, diuréticos y distribución del tratamiento aleatorio (ramiprilo o vitamina E) y concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 en la orina.

Todos los índices P son bilaterales y los intervalos de confianza se calculan en el nivel del 95 por ciento.

En la Tabla 1 se muestran las características de referencia de los casos y referencias. Como era de esperar, los pacientes en los que se desarrolló posteriormente el infarto de miocardio, el ictus o la muerte cardiovascular presentaban un índice de masa corporal media superior y presión sanguínea de referencia y era más probable que los que quedaban libres de estos episodios eran fumadores en la actualidad o presentaban antecedentes de hipertensión, diabetes, infarto de miocardio o enfermedad vascular periférica. Había también casos tratados con mayor frecuencia con diuréticos o bloqueantes del canal del calcio en referencias y con menor frecuencia tratados con fármacos liporreductores o al azar para la terapia con ramiprilo. Debido al emparejamiento, la edad y el sexo de los casos y referencias fueron similares.

La media geométrica y las concentraciones urinarias medias de 11-dehidro tromboxano B2 en la referencia fueron significativamente superiores entre los pacientes que desarrollaron posteriormente el resultado de la combinación de infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular en comparación con los que quedaban libres de estos episodios (Tabla 2). La diferencia entre los casos y las referencias fue máxima en los que padecían infarto de miocardio (24,5 frente a 20,9 ng/mmol de creatinina, P=0,003) o murieron de causa cardiovascular (25,6 frente a 20,4 ng/mmol de creatinina, P<0,001).

Las oportunidades ajustadas para el resultado de la combinación de infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular aumentaron en cada cuartil con concentración creciente de 11-dehidro tromboxano B2 urinario de referencia (P para la tendencia a través de cuartiles, 0,01) con pacientes en el cuartil superior que presenta un riesgo de 1,8 veces mayor que los del cuartil inferior (razón de oportunidades [OR] 1,8; 95% de intervalo de confianza [CI] 1,2-2,9, P=0,009) (Fig. 1). Una asociación similar se observó con el infarto de miocardio (P para la tendencia a través de los cuartiles, 0,005) y la muerte cardiovascular (P para la tendencia a través de los cuartiles, 0,001) (Tabla 3). Los resultados fueron similares con o sin ajuste de las diferencias de referencia entre los casos y las referencias incluyendo los factores de riesgo vascular convencionales, intervenciones conjuntas y distribución aleatoria del tratamiento.

Para evaluar si el aumento de las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 urinario de referencia estaba asociado más bien a los episodios cardiovasculares precoces que a los tardíos se realizaron análisis independientes en pacientes que experimentaron un episodio en los primeros 12 meses del comienzo del estudio y en los pacientes cuyo episodio se produjo más de 12 meses después del comienzo del estudio. Las oportunidades ajustadas para el resultado de la combinación de infarto de miocardio, ictus o muerte cardiovascular se asociaron al cuartil superior de 11-dehidro tromboxano B2 urinario en comparación con el cuartil inferior fue 2,9 (95% CI: 0,9-9,1) para los episodios que se produjeron en los primeros 12 meses y 1,7 (95% CI: 1,0-2,7) para los episodios que se produjeron después de los primeros 12 meses.

Utilizando un modelo de regresión lineal multivariable, las variables que se observaron que estaban independientemente asociadas a las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 urinario de referencia en la orina fueron: sexo femenino (P=0,004); índice de masa corporal (P=0,001), antecedentes de enfermedad vascular periférica (P=0,01), fumador de cigarrillos actualmente (P=0,09), utilización de los bloqueantes de canal del calcio (P=0,08) y distribución aleatoria de vitamina E (P=0,04). Sin embargo, estas variables combinadas pudieron pronosticar menos del 5% de la variación en las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 urinario (R^2 -cuadrada 0,045).

Estos resultados indican que las concentraciones de 11-dehidro tromboxano B2 urinario pueden utilizarse como indicador de resistencia a la aspirina y que la resistencia a la aspirina es un factor pronóstico de la aparición de un episodio cardiovascular.

60

65

ES 2 297 184 T3

TABLA 1
*Características de referencia de los participantes en el estudio**

	Características [†]	Casos (n=488)	Referencias (n=488)	Índice P
5	Edad - años	67,3±7,2	67,4±7,2	0,78
10	Sexo femenino - n° (%)	77 (15,8)	77 (15,8)	-
15	Índice de masa corporal [‡]	27,8±4,1	26,9±3,7	<0,001
20	Frecuencia cardíaca - pulsaciones/min	66,2±10,3	65,6±10,9	0,41
25	SBP - mm Hg	137,1±20,6	133,5±18,0	0,002
30	DBP - mm Hg	76,6±9,8	75,6±9,4	0,08
35	Antecedentes de enfermedad coronaria - n° (%) cualquiera	469 (96,1)	464 (95,1)	0,54
40	Antecedentes de enfermedad coronaria - n° (%)			
45	MI	364 (74,6)	309 (63,4)	<0,001
50	Angina estable	355 (72,7)	336 (68,9)	0,19
55	Angina inestable	184 (37,7)	176 (36,1)	0,65
60	CABG	176 (36,1)	154 (31,6)	0,15
65	PCI	87 (17,8)	104 (21,3)	0,22
70	Ictus o TIA - n° (%)	59 (12,1)	40 (8,2)	0,06
75	Enfermedad vascular periférica - n° (%)	240 (49,2)	173 (35,5)	<0,001
80	Hipertensión - n° (%)	219 (44,9)	154 (31,6)	<0,001
85	Diabetes - n° (%)	159 (32,6)	105 (21,5)	<0,001
90	Colesterol total elevado - n° (%)	279 (57,2)	310 (63,5)	0,38
95	Fumadores de cigarrillos actuales - (%)	81 (16,6)	57 (11,7)	0,03
100	Medicaciones - n° (%)			
105	Aspirina	488 (100)	488 (100)	-
110	B-bloqueador	241 (49,4)	235 (48,2)	0,76
115	Agente liporreductor	121 (24,8)	166 (34,0)	0,002
120	Diuréticos	73 (15,0)	34 (7,0)	<0,001
125	Bloqueantes de canal del calcio	289 (59,2)	238 (48,8)	0,002
130	Ramiprilo	227 (46,5)	274 (56,1)	0,003
135	Vitamina E	246 (50,4)	252 (51,6)	0,74

*Los valores más-menos son la media ± SD

†CABG indica cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria, CV cardiovascular, DBP presión sanguínea diastólica, MI infarto de miocardio, PCI intervención coronaria percutánea, SBP presión sanguínea sistólica, TIA ataque isquémico transitorio.

‡El índice de masa corporal es el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros

TABLA 2

Concentraciones de 11-dehidro tromboxano B₂ urinario de referencia en casos y referencias

Resultados	Concentración de 11-dehidro tromboxano B ₂ (ng/mmol de creatinina)			Índice P
	Casos	Referencias		
MI, ictus o muerte CV (n=488)				
Media geométrica	24,5	21,5		0,01
Mediana	22,7	21,0		0,01
MI (n=378)				
Media geométrica	24,5	20,9		0,003
Mediana	22,8	20,3		0,001
Ictus (n=80)				
Media geométrica	25,0	27,4		0,47
Mediana	21,3	25,9		0,40
Muerte CV (n=244)				
Media geométrica	25,6	20,4		<0,001
Mediana	24,0	19,9		<0,001

*MI indica infarto de miocardio, CV cardiovascular.

TABLA 3

Oportunidades ajustadas de muerte cardiovascular, infarto de miocardio e ictus según las concentraciones urinarias de referencia de 11-dehidro tromboxano B₂*

Resultado [†]	Cuartiles de concentración de 11-dehidro tromboxano B ₂ (ng/mmol de creatinina)				P para tendencia
	<15,1	15,1-21,8	21,9-33,7	>33,7	
MI/Ictus/Muerte CV (n=488)					
Razón de oportunidades (95 CI)	1,0	1,3 (0,9-2,0)	1,4 (0,9-2,2)	1,8 (1,2-2,7)	0,01
Índice P		0,13	0,09	0,009	
MI (n=378)					
Razón de oportunidades (95 CI)	1,0	1,3 (0,8-2,1)	1,5 (1,0-2,5)	2,0 (1,2-3,4)	0,005
Índice P		0,26	0,07	0,006	
Ictus (n=80)					
Razón de oportunidades (95 CI)	1,0	2,5 (0,6-10,0)	0,6 (0,2-2,2)	0,6 (0,2-1,8)	0,20
Índice P		0,18	0,45	0,34	
Muerte CV (n=244)					
Razón de oportunidades (95 CI)	1,0	2,0 (1,0-3,9)	2,5 (1,3-4,9)	3,5 (1,7-7,4)	0,001
Índice P		0,06	0,006	<0,001	

*Ajustadas por diferencias de referencia entre casos y referencias.

[†]CI indica intervalo de confianza, MI infarto de miocardio, CV cardiovascular.

Referencias

Elkelboom J. et al. Aspirin resistance and the risk of myocardial infarction, stroke, o cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105:1650.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para evaluar la resistencia a la aspirina en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento de terminar la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 en una muestra de fluido corporal del paciente; comparar la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 en la muestra con un conjunto predeterminado de cuartiles de concentración que comprende un primer cuartil, un segundo cuartil, un tercer cuartil y un cuarto cuartil, en el que el primer cuartil comprende concentraciones inferiores a 15,1 ng/mmol de creatinina, el segundo cuartil comprende concentraciones entre 15,1 ng/mmol de creatinina y 21,8 ng/mmol de creatinina, el tercer cuartil comprende concentraciones entre 21,9 ng/mmol de creatinina y 33,7 ng/mmol de creatinina y el cuarto cuartil comprende concentraciones superiores a 33,8 ng/mmol de creatinina; y determinar en qué cuartil se encuentra la concentración de la muestra; en el que una concentración de 11-dehidro tromboxano B2 en el segundo, tercero o cuarto cuartil es indicativo de la resistencia a la aspirina y la resistencia aumenta a medida que aumenta cada cuartil.
- 10 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la resistencia a la aspirina se correlaciona con el riesgo de un episodio cardiovascular, y el riesgo relativo de un episodio cardiovascular aumenta a medida que aumenta cada cuartil.
- 20 25 3. Procedimiento para evaluar el riesgo relativo de un episodio cardiovascular en un paciente que toma aspirina, comprendiendo dicho procedimiento determinar la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 en una muestra de fluido biológico del paciente; comparar la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 con un conjunto predeterminado de cuartiles de concentración que comprende un primer cuartil, un segundo cuartil, un tercer cuartil y un cuarto cuartil, en el que el primer cuartil presenta una concentración inferior a 15,1 ng/mmol de creatinina, el segundo cuartil presenta una concentración entre 15,1 ng/mmol de creatinina y 21,8 ng/mmol de creatinina, el tercer cuartil presenta una concentración entre 21,9 ng/mmol de creatinina y 33,7 ng/mmol de creatinina y el cuarto cuartil presenta una concentración superior a 33,8 ng/mmol de creatinina; y determinar en qué cuartil se encuentra la concentración de la muestra; en el que el riesgo relativo aumenta para una concentración en el segundo, tercero o cuarto cuartil con relación a una concentración en el primer cuartil.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho paciente presenta una enfermedad vascular arterial.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la concentración de 11-dehidro tromboxano B2 es determinada utilizando un inmunoanálisis.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el inmunoanálisis es un ELISA, un RIA o un fluoroinmunoanálisis.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el fluido biológico es la orina.
8. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el episodio cardiovascular es una combinación de infarto de miocardio, ictus y muerte cardiovascular y el riesgo relativo es 1,3 veces para una concentración en el segundo cuartil, 1,4 veces para una concentración en el tercer cuartil y 1,8 veces para una concentración en el cuarto cuartil en comparación con el de para una concentración en el primer cuartil durante 5 años.

45

50

55

60

65

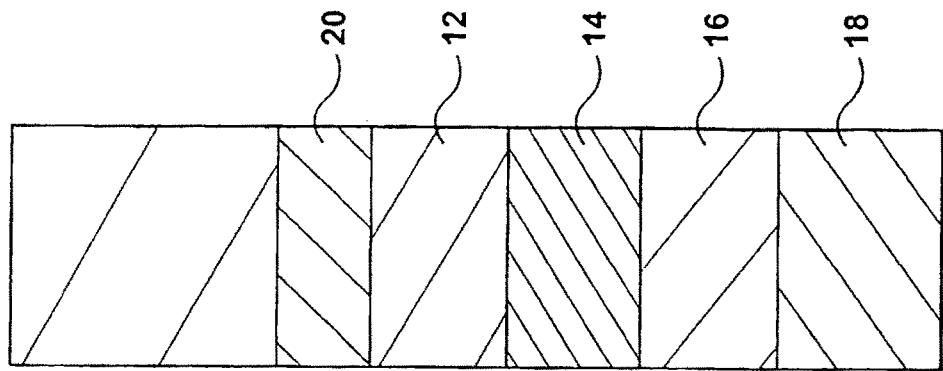


FIG. 2

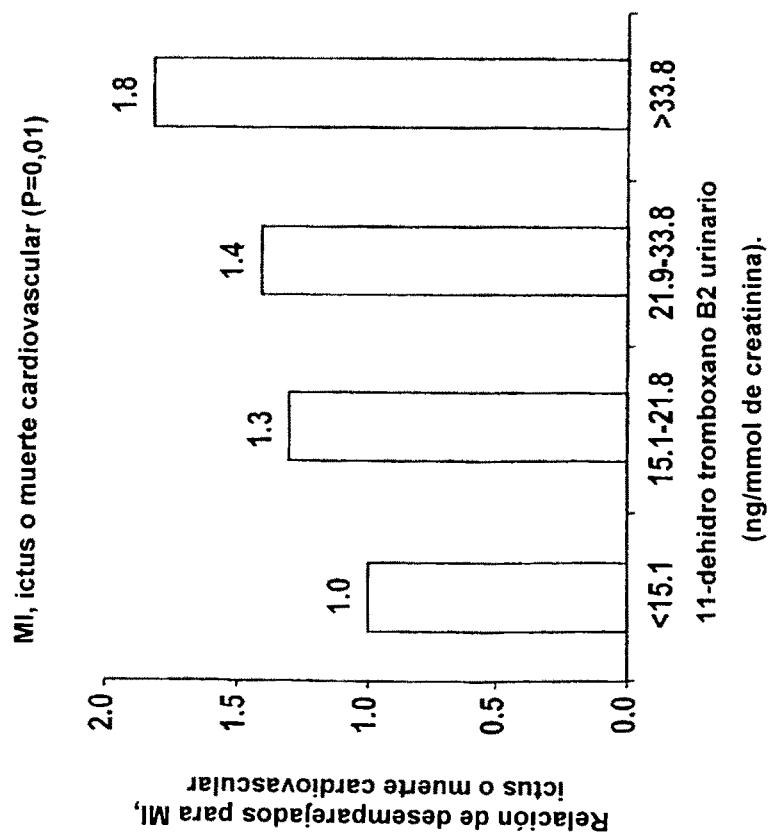


FIG. 1

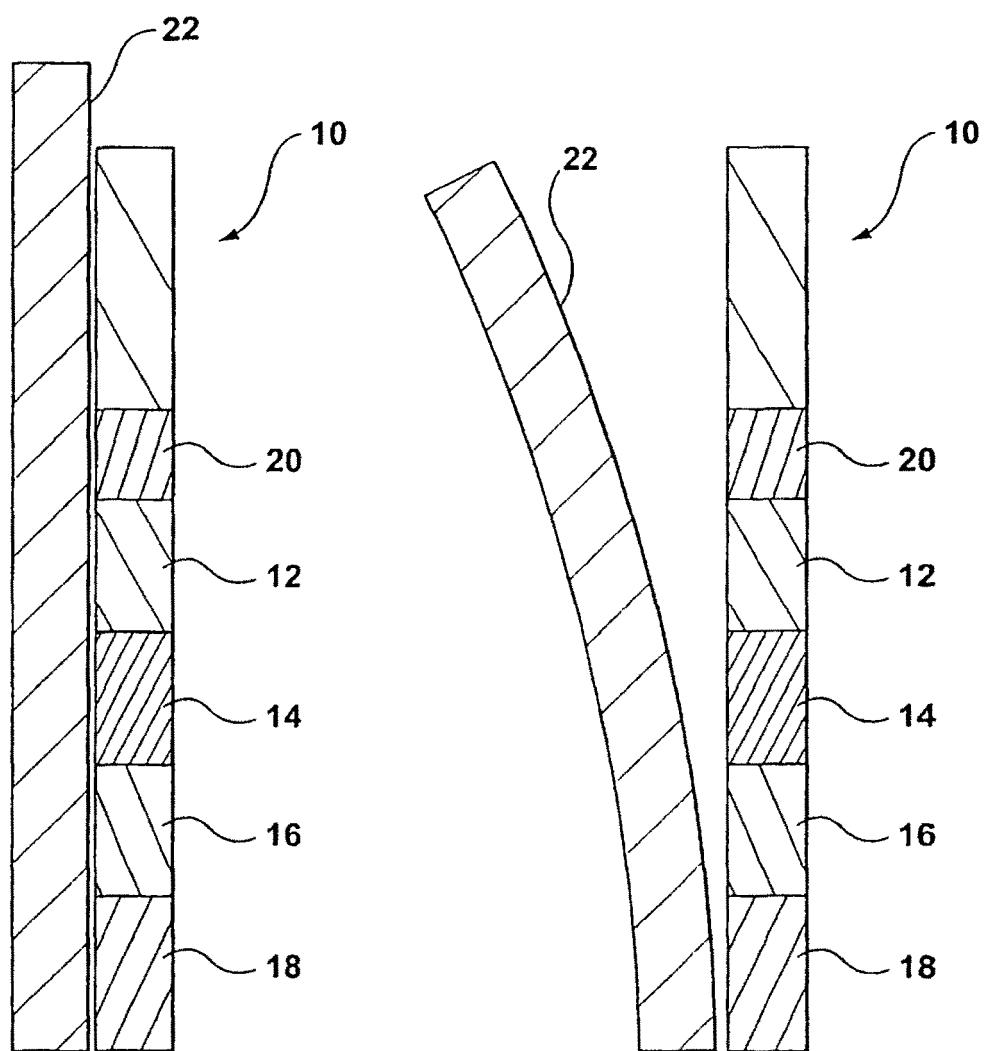


FIG. 3

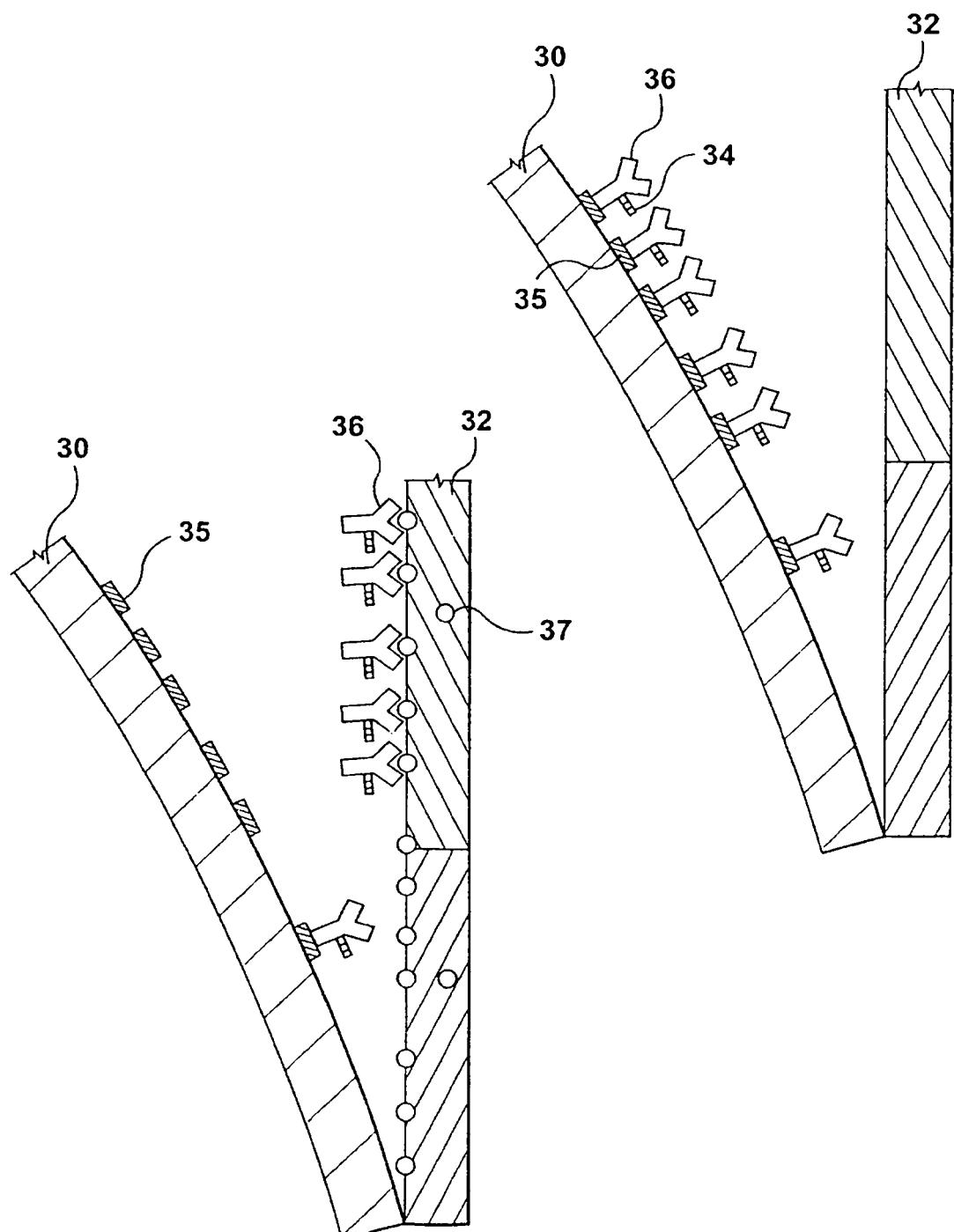


FIG. 4

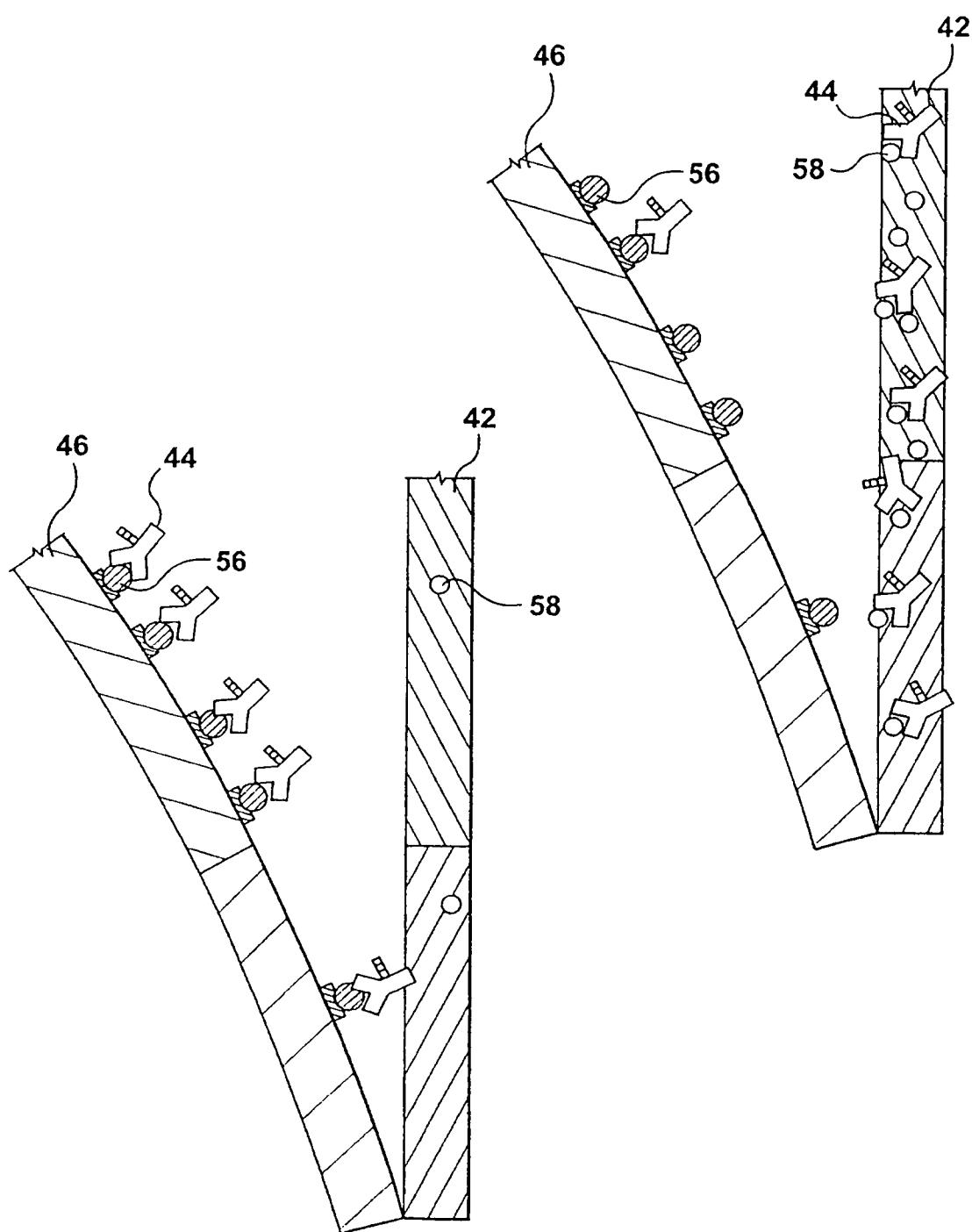


FIG. 5