

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 989**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/37** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07707707 .1**  
96 Fecha de presentación: **30.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1988174**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE UN SÍNDROME DE COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA.**

30 Prioridad:  
**31.01.2006 JP 2006023596**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2012**

73 Titular/es:  
**Mitsubishi Chemical Medience Corporation**  
**2-8, Shibaura 4-chome Minato-ku**  
**Tokyo 108-8559, JP y**  
**Juridical Foundation The Chemo-Sero-**  
**Therapeutic Research Institute**

72 Inventor/es:  
**ONO, Tomoko;**  
**WATANABE, Shinichiro;**  
**FURUSAKI, Fumio y**  
**IGAMI, Ko**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 989 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la determinación del estado de un síndrome de coagulación intravascular diseminada

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar un estado de coagulación intravascular diseminada (denominada en lo sucesivo en este documento como CID).

**Técnica antecedente**

En la CID, se forman microtrombos en la microvasculatura, en presencia de una grave enfermedad subyacente. Los microtrombos dañan la microcirculación y causan disfunción orgánica o una tendencia a la hemorragia. Las siguientes tres insuficiencias o reacciones se observan en la CID:

- 10 (1) La formación del microtrombo causa una insuficiencia microcirculatoria, y diversos órganos comienzan a funcionar mal debido a la isquemia.  
 (2) La formación del microtrombo promueve una coagulopatía de consunción, es decir, un aumento de la producción de factor tisular en la superficie de células endoteliales conduce a la activación de una ruta de coagulación extrínseca. Además, se consumen factores de coagulación y plaquetas, y se produce una  
 15 tendencia a la hemorragia.  
 (3) Hiperfibrinólisis, es decir, el sistema fibrinolítico activado debido a la activación de la coagulación, genera plasmina, que degrada la fibrina. Cuando el inhibidor de  $\alpha_2$ -plasmina ( $\alpha_2$ PI), que inhibe la plasmina, se consume y disminuye a menos del 60 % del nivel normal, la plasmina degrada la fibrina y se produce una  
 20 tendencia a la hemorragia.

20 La CID se caracteriza principalmente por la formación del microtrombo causada por la activación anormal y continua de la coagulación, pero el sistema fibrinolítico también está activado. El equilibrio de coagulación y fibrinólisis varía de acuerdo con las enfermedades subyacentes o los casos. Como tales casos, se conocen un caso en el que la coagulación está notablemente activada, pero el sistema fibrinolítico está suprimido, y un caso en el que ambos sistemas de coagulación y fibrinolítico están notablemente activados. El primero se denomina como CID de  
 25 coagulación dominante, y el último es CID de coagulación suprimida. La CID de coagulación dominante viene acompañada a menudo por infecciones, particularmente septicemia, y a menudo se observa una insuficiencia orgánica como un síntoma clínico en pacientes con CID de coagulación dominante. En pacientes con CID de coagulación suprimida, los FDP (Productos de degradación de la fibrina) y el PIC (Complejo de plasmina/inhibidor de plasmina), que son marcadores fibrinolíticos, están notablemente aumentados, y a menudo se observa una  
 30 hemorragia. La enfermedad subyacente de la misma es leucemia promielocítica aguda.

Dado que un tratamiento retardado para CID conduciría directamente a la muerte, la CID es una enfermedad urgente que requiere un diagnóstico temprano y un tratamiento temprano. El diagnóstico de CID se realiza actualmente de acuerdo con los criterios de diagnóstico para CID, establecidos por el Ministerio de Sanidad y Bienestar (Japón). En estos criterios de diagnóstico, la CID se evalúa valorando cada valor de 1) la presencia o la ausencia de insuficiencia  
 35 orgánica, 2) el número de plaquetas, 3) los FDP, 4) fibrinógeno, y 5) la proporción de PT (proporción del tiempo de protrombina). Los criterios de diagnóstico son adecuados para un diagnóstico definitivo de CID, pero no son adecuados para un diagnóstico temprano de CID. Cuando se realiza un tratamiento clínico de CID de acuerdo con los criterios de diagnóstico, hay muchos casos en los que la CID está en una fase tan avanzada que es demasiado tarde. Además, hay no pocos casos, en el campo clínico, en los que es difícil realizar una diferenciación en cuanto a  
 40 si un número de plaquetas reducido es causado o no por CID. Los ejemplos de afecciones o enfermedades con dicho número de plaquetas reducido incluyen, por ejemplo, una afección acompañada por mielosupresión (tal como fármacos, infecciones víricas, enfermedades sanguíneas causadas por dishemopoyesis, cirrosis, insuficiencia hepática, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT)/síndrome urémico hemolítico (SUH), y efusión pleural excesiva o ascitis. Estas afecciones o enfermedades están acompañadas a menudo por FDP elevados y/o dímero-D elevado  
 45 así como una disminución de las plaquetas, y se hace más difícil realizar una diferenciación de la CID.

Como tratamiento para CID, se administra heparina o antitrombina III de bajo peso molecular, para suprimir las múltiples formaciones de trombos en los vasos sanguíneos e inhibir la progresión de una coagulopatía de consunción. A un paciente que padece CID de coagulación suprimida, se le administra mesilato de gabexato que tiene una actividad antitrombina y un efecto antifibrinolítico. En un paciente con CID acompañada por enfermedades  
 50 sanguíneas que muestran un nivel reducido de la producción de plaquetas, es esencial reponer plaquetas mediante la administración de un concentrado de plaquetas. A un paciente que padece CID con fibrinógeno en sangre reducido, se le realiza una transfusión con plasma fresco congelado (FFP).

Un estado de enfermedad designado anemia hemolítica microangiopática (AHMA) se observa en PTT, así como CID o SUH. Si muchos microtrombos se forman en vasos sanguíneos debido a una causa particular, muchas partes de la micro-circulación se vuelven estrechas. Los eritrocitos que han pasado por la fuerza a través de estas partes estrechadas se rompen mecánicamente, y se produce hemólisis. Estos procesos se consideran el mecanismo del desarrollo de AHMA. Los principales componentes de los microtrombos, que reducen el diámetro interno de los vasos, son fibrina y plaquetas en CID y PTT o SUH, respectivamente.

La PTT fue descrita por primera vez en 1924 por Moschcowitz en los Estados Unidos. La PTT es una grave enfermedad sistémica que es causada por la coagulación de arteriolas con agregados de plaquetas (trombos plaquetarios), y se caracteriza por los siguientes síntomas: (1) trombocitopenia (se observa el púrpura en la piel), (2) anemia hemolítica microangiopática (causada por la rotura de los eritrocitos), (3) insuficiencias renales, (4) fiebre y (5) alteraciones neurológicas.

Como factor de PTT, se identificó una proteasa de escisión específica del vWF del plasma como factor hemostático (proteasa de escisión del VWF; VWF-CP), también conocida como ADAMTS13. Se sabe que la cantidad de ADAMTS13 se reduce significativamente en pacientes con PTT, en comparación con personas sanas (por ejemplo, referencia no de patente 1, referencia no de patente 2 o referencia de patente 1). También se sabe que una deficiencia de ADAMTS13 no solamente se ha descubierto en pacientes con PTT, sino también en pacientes con coagulación intravascular diseminada inducida por septicemia (Ono et al., Blood 2006; 107: 528- 534). Si ADAMTS13 es deficiente o está reducido, multímeros de vWF inusualmente grandes (UL-vWFM) liberados de células endoteliales vasculares no son escindidos, y se produce una excesiva agregación de plaquetas debido a un alto esfuerzo cortante causado en la microcirculación o similar, y como resultado, los vasos sanguíneos resultan ocluidos con trombos.

Por ejemplo, la referencia de patente 2 describe un procedimiento de detección de trombosis o el grado de trombofilia, caracterizado por medir ADAMTS13, y leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia promielocítica aguda, lupus eritematoso sistémico, embolia pulmonar, infarto cerebral, enfermedad veno-oclusiva, leucemia linfocítica aguda, microangiopatía trombótica, púrpura trombocitopénica trombótica, síndrome urémico hemolítico, y trombosis venosa profunda se usan para ejemplificar trombosis. La referencia de patente 3 describe un procedimiento de detección de trombosis plaquetaria o insuficiencia orgánica en un paciente que padece CID o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), que comprende analizar ADAMTS13 y/o un factor de escisión del mismo (por ejemplo, elastasa, plasmina o trombina).

Además, se conoce una PTT atípica que tiene una actividad de ADAMTS13 ligeramente reducida o normal. Se describieron diversas causas para PTT atípica, e incluyen factores congénitos y factores adquiridos. Una anomalía de genes, tales como un Factor H plasmático que tiene una actividad reguladora del complemento, o la proteína transmembrana celular endotelial vascular CD46, se describieron como los factores congénitos.

La PTT es una enfermedad extremadamente rara, que está causada generalmente por factores adquiridos, pero se conocen casos raros causados por factores congénitos como se describen a continuación.

Los síntomas clínicos en PTT incluyen, por ejemplo, diarrea, dolor abdominal y sangre en las heces debido a enteritis isquémica, síntomas neurológicos tales como convulsión y trastorno visual, y trastorno renal. Como descubrimientos de laboratorio, se observan diversos cambios acompañados por hemólisis, por ejemplos, eritrocitos de sangre periférica rotos por la formación del trombo, anemia, plaquetas reducidas, LDH del suero (lactato deshidrogenasa), bilirrubina indirecta elevada, o haptoglobina reducida. Se observa creatina en suero elevada en pacientes con trastorno renal.

En un tratamiento para PTT congénita ampliamente usado actualmente, se administra por transfusión plasma fresco congelado (FFP) cada dos o tres semanas para reponer ADAMTS13 y mantener un número de plaquetas, es decir, para impedir el desarrollo de PTT. Una transfusión de plaquetas está contraindicada en pacientes con PTT congénita. En aproximadamente un tercio de todos los pacientes con PTT adquirida, una actividad de ADAMTS13 está notablemente reducida, y casi todos los casos son positivos para un anticuerpo específico para ADAMTS13. Por lo tanto, la administración de FFP en solitario es insuficiente para tratar PTT adquirida e idiopática, y un intercambio de plasma (PE) es la primera opción. El PE se realiza a menudo junto con esteroides o una terapia de pulso de esteroides. Por supuesto, una transfusión de plaquetas antes del PE está contraindicada. Los efectos del PE se resumen como 1) la reposición de ADAMTS13, 2) la retirada de un inhibidor de ADAMTS13, 3) la retirada de UL-vWFM, y 4) la reposición de vWF normal necesario para la hemostasis. El uso de un inmunosupresor, tal como vincristina o endoxano, o esplenectomía debe considerarse para casos intratables o casos repetitivos. La tasa de mortalidad antes de la introducción del PE o la terapia de transfusión de FFP era superior al 80 %, y el pronóstico era muy malo. Sin embargo, dicha introducción o una combinación de la misma con una terapia antiplaquetas ha mejorado notablemente el pronóstico, de modo que la tasa de supervivencia se vuelve de aproximadamente el 90 % o más, actualmente. Sin embargo, se conocen muchos casos que no responden al tratamiento y casos recurrentes, y sigue habiendo problemas por resolver. Además, la PTT avanzada no responde al tratamiento y tiene un mal pronóstico y, por lo tanto, son necesarios un diagnóstico temprano y un tratamiento temprano.

[referencia no de patente 1] Zheng X. et al., J. Biol. Chem., (Estados Unidos), 2001, vol. 276, p. 41059-41063

[referencia no de patente 2] Furlan M. et al., Blood, (Estados Unidos), 1997, vol. 89, p. 3097-3103

[referencia de patente 1] WO 00/50904

[referencia de patente 2] WO 2005/062054

[referencia de patente 3] WO 2006/049300

**Descripción de la invención**

**PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN**

5 Como se ha descrito anteriormente, se sabía que pacientes a los que se diagnosticó CID, en base a los criterios de diagnóstico usando marcadores conocidos y descubrimientos clínicos, incluyen muchos casos en los que las afecciones no resultaron aliviadas por el tratamiento para CID. Con respecto a pacientes con plaquetas reducidas en estos casos, se considera que si a los pacientes se les diagnosticó PTT, y se les trató con una terapia apropiada, tal como PE, un pronóstico sería favorable. Aunque una transfusión de plaquetas puede seleccionarse como un tratamiento para CID, dicha transfusión de plaquetas está contraindicada en PTT, incluso aunque fuera con plaquetas notablemente reducidas, dado que la transfusión de plaquetas agravará la afección, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, las plaquetas reducidas se observan tanto en CID como en PTT, pero en el campo clínico se desea distinguirlas claramente entre sí, para realizar un diagnóstico apropiado y un tratamiento apropiado.

15 Los inventores de la presente invención han realizado estudios exhaustivos, y han descubierto que un grupo de pacientes a los que se diagnosticó CID incluían un subgrupo de pacientes posiblemente con PTT adquirida, clasificando a los pacientes con CID de acuerdo con la cantidad (concentración) de ADAMTS13 o la actividad enzimática de ADAMTS13, o la combinación de las mismas, preferiblemente una combinación de la cantidad (concentración) de ADAMTS13 y/o la actividad enzimática de ADAMTS13 y la cantidad (concentración) de vWF. Es decir, los inventores de la presente invención diferenciaron "CID a diagnosticar como PTT" de "CID irrelevante respecto a PTT", que no podían diferenciarse entre sí en base a descubrimientos clínicos y marcadores conocidos, y descubrieron que cada grupo de dichos pacientes puede tratarse con una terapia específica para cada enfermedad para mejorar el pronóstico, y la presente invención se completó.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de diferenciación entre un paciente con PTT y un paciente con CID, que no podían distinguirse entre sí en base a descubrimientos clínicos y marcadores conocidos.

**MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS**

25 El objeto puede resolverse mediante la presente invención, es decir, un procedimiento como se caracteriza por las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con una realización preferida, la proteasa de escisión del factor de von Willebrand se analiza inmunológicamente.

30 El término "análisis" como se usa en este documento incluye una detección para determinar la presencia o la ausencia de una sustancia (por ejemplo, ADAMTS13 o vWF) a analizar, y una medición para determinar cuantitativa o semi-cuantitativamente la cantidad (concentración) o actividad de una sustancia a analizar.

**EFFECTOS DE LA INVENCIÓN**

35 La CID y la PTT son similares en sus estados, y por lo tanto, son difíciles de diagnosticar con precisión. Además, en ambos casos, si un tratamiento apropiado determinado por un diagnóstico temprano no se realiza en una fase temprana, el paciente morirá y, por lo tanto, es muy importante diferenciar "CID a diagnosticar como PTT" de "CID irrelevante respecto a PTT". De acuerdo con la presente invención, en pacientes a los que se diagnosticó CID en base a los presentes criterios de diagnóstico, "CID a diagnosticar como PTT" puede diferenciarse de "CID irrelevante respecto a PTT", y un tratamiento apropiado puede realizarse para elevar la tasa de supervivencia o reducir la tasa de mortalidad.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

40 La figura 1 es un gráfico que muestra el resultado de la medición de cantidades del antígeno de ADAMTS13 (Aag).  
 La figura 2 es un gráfico que muestra el resultado de la medición de actividades enzimáticas de ADAMTS13 (Aact).  
 45 La figura 3 es un gráfico que muestra el resultado de la medición de cantidades del antígeno de vWF (Vag).  
 La figura 4 es un gráfico que muestra Vag/Aag.  
 La figura 5 es un gráfico que muestra Vag/Aact.

**MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCIÓN**

[1] Procedimiento de determinación de la presente invención

50 En el procedimiento de la presente invención, el estado de CID puede determinarse analizando la proporción de la cantidad (concentración) de vWF y al menos una (preferiblemente ambas) de la cantidad (concentración) de ADAMTS13 y/o la actividad enzimática de ADAMTS13, en una muestra obtenida de un paciente con CID.

La expresión "determinar un estado de CID" como se usa en este documento incluye determinar diversos estados en

un paciente que padece CID, que son útiles para la decisión de un tratamiento apropiado, por ejemplo, para seleccionar pacientes a los que se diagnosticarán de forma precisa PTT, y que serán tratados con otra terapia, entre los pacientes a los que se les diagnosticó CID, es decir, diferenciar entre "CID a diagnosticar como PTT" y "CID irrelevante respecto a PTT". Además, la expresión "determinar un estado de CID" como se usa en este documento incluye además una decisión y una predicción en base a la determinación de los estados, por ejemplo, una determinación de un tratamiento apropiado, un pronóstico y una monitorización.

En el procedimiento de la presente invención, con respecto a pacientes que son difíciles de diagnosticar y están contenidos en un grupo de pacientes de CID, el grupo de pacientes de CID puede clasificarse, usando como índice una combinación de la cantidad (concentración) y/o la actividad enzimática de ADAMTS13 y la cantidad (concentración) de vWF [por ejemplo, una proporción de la cantidad de vWF con respecto a la cantidad (concentración) y/o la actividad enzimática de ADAMTS13], en, por ejemplo, tres sub-grupos para diferenciar "CID a diagnosticar como PTT" de "CID irrelevante respecto a PTT" y, de este modo, puede proponerse una terapia apropiada específica para cada paciente. Como índice para la clasificación, pueden seleccionarse umbrales de la cantidad (concentración) de ADAMTS13 y la actividad de ADAMTS13.

La expresión "proteasa de escisión del factor de von Willebrand (proteasa de escisión de vWF)" como se usa en este documento significa una metaloproteasa, algunas veces denominada como ADAMTS13, que escinde específicamente el factor de von Willebrand (vWF) en la unión entre tirosina (842) y metionina (843) contenida en un dominio A2 del mismo.

Se sabe que la cantidad de ADAMTS13 se reduce significativamente en pacientes con PTT en comparación con personas sanas [por ejemplo, Zheng X. et al., J. Biol. Chem., (Estados Unidos), 2001, vol. 276, p. 41059-41063; Furlan M. et al., Blood, (Estados Unidos), 1997, vol. 89, p. 3097-3103; y WO 00/50904]. Ono et al., describieron que la cantidad de ADAMTS13 se reducía significativamente en pacientes de CID con diversas enfermedades subyacentes pero diagnosticados en base al valor de CID, en comparación con personas sanas, y que las cantidades de ADAMTS13 en un grupo de pacientes a los que se diagnosticó PTT eran del 5 % al 45 %, y las cantidades de ADAMTS13 en un grupo de pacientes de CID variaban entre el 10 % y el 95 % [Ono T. et al., The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, 2004 (Los resúmenes se publicaron el 1 de octubre.)].

Además, muchas observaciones sobre ADAMTS13 en diversas enfermedades se han descrito recientemente, y mientras que se consideraba que la actividad de ADAMTS13 se reducía notablemente en pacientes de PTT, se describió que la actividad de ADAMTS13 no se reducía marcadamente en el 60 % de los pacientes de PTT (Masanori Matsumoto, Vascular Biology & Medicine, 2005, vol. 6, p. 65-72).

Sin embargo, no se ha descrito que "CID a diagnosticar como PTT" pueda diferenciarse de "CID irrelevante respecto a PTT" en pacientes a los que se les diagnosticó CID usando solamente ADAMTS13.

Un sujeto (una persona a diagnosticar) al que se le puede aplicar el procedimiento de la presente invención es un paciente de CID. Una muestra preferida a ensayar es, por ejemplo, sangre tal como plasma o un suero. Los ejemplos de muestras diferentes de sangre incluyen diversos fluidos corporales, tales como fluidos celulares o tisulares, linfa, un fluido tímico, un fluido ascítico, un fluido amniótico, jugos gástricos, orina, jugos pancreáticos, líquido cefalorraquídeo y saliva. El plasma es preferiblemente plasma citratado o plasma heparinizado.

En el procedimiento de la presente invención, una determinación de un estado de CID y una decisión de terapia apropiada pueden realizarse recogiendo muestras de pacientes de CID y pacientes de PTT, midiendo la concentración de ADAMTS13, la actividad de ADAMTS13 y/o la concentración de vWF, y comparando los valores medidos. Para distinguir pacientes de CID posiblemente con PTT de otros pacientes de CID, es preferible haber determinado previamente diversos umbrales para la evaluación, tales como umbrales para la concentración de ADAMTS13 y la actividad de ADAMTS13, y un umbral para una proporción de vWF con respecto a la concentración o actividad de ADAMTS13, usando muestras recogidas de pacientes de PTT.

Como se muestra en los Ejemplos descritos a continuación, puede realizarse, por ejemplo, la siguiente clasificación. En primer lugar, pacientes en los que se aplican dos o tres puntos de entre los siguientes puntos 1) a 3), se clasifican en un "grupo de pacientes de CID que posiblemente padecen PTT (grupo A)", y los otros se clasificaron en un "grupo de pacientes de CID que posiblemente no padecen PTT (grupo B)".

- 1) La cantidad (en lo sucesivo en este documento denominada como Aag) de ADAMTS13 es, por ejemplo, el 30 % o menos.
- 2) La actividad (en lo sucesivo en este documento denominada como Aact) de ADAMTS13 es, por ejemplo, el 15 % o menos.
- 3) La proporción (Aag/Aact) de la cantidad de ADAMTS13 con respecto a la actividad de ADAMTS13, por ejemplo, es de 2,0 o más. Estos grupos de pacientes (grupo A y grupo B) pueden clasificarse además, en base a una proporción (Vag/Aag) de la cantidad de vWF (en lo sucesivo en este documento denominada como Vag) con respecto a la cantidad de ADAMTS13 (Aag) y una proporción (Vag/Aact) de la cantidad de vWF con respecto a la actividad ADAMTS13 (Aact), en los tres grupos siguientes:

Grupo 1: Vag/Aag es, por ejemplo, 8 o más, y Vag/Aact es, por ejemplo, 16 o más.

Grupo 2: Vag/Aag es, por ejemplo, 8 o menos, y Vag/Aact es, por ejemplo, 16 o más.  
 Grupo 3: Diferentes de los grupos 1 y 2 (es decir, Vag/Aact es, por ejemplo, menor de 16.)

5 Como se muestra en los Ejemplos descritos a continuación, dos pacientes a los que se había diagnosticado PTT se clasificaron en el Grupo 1. Además, como se muestra en los Ejemplos, entre el Grupo 1 al Grupo 3, el Grupo 1 y el Grupo 2 son un "grupo de pacientes de CID a diagnosticar con PTT", y el Grupo 3 es un "grupo de pacientes de CID irrelevante con respecto a PTT".

Los valores anteriores Aag, Aact, y Vag son valores relativos con respecto a valores normales, y las anteriores proporciones (Aact/Aag, Vag/Aag, y Vag/Aact) se calculan a partir de estos valores relativos.

10 Cuando los umbrales para la evaluación se han determinado previamente, los valores medidos obtenidos de un sujeto cuyo estado debe predecirse se usan para analizar Aag y/o Aact, o Aag y/o Aact y Vag (tales como Vag/Aag y/o Vag/Aact), y a continuación, la evaluación y/o predicción anteriores pueden realizarse para el sujeto. Se considera que los umbrales para la evaluación dependen de diversas condiciones, tales como una enfermedad subyacente, el sexo, o la edad. Sin embargo, los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente los intervalos normales de los umbrales para la evaluación, seleccionando una población estadística apropiada correspondiente al sujeto o sujetos y procesando estadísticamente los datos obtenidos de esa población.

15 En el procedimiento de la presente invención, un procedimiento de análisis de la concentración de ADAMTS13 no está limitado, siempre que una cantidad de ADAMTS13 pueda determinarse cuantitativa o semi-cuantitativamente, o una presencia o ausencia de ADAMTS13 pueda evaluarse, por el procedimiento de análisis. Los ejemplos del procedimiento de análisis incluyen un procedimiento inmunológico que usa un anticuerpo anti-ADAMTS13 o un fragmento del mismo (tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, un ensayo de aglutinación en látex, un inmunoensayo de quimioluminiscencia, un procedimiento con anticuerpo fluorescente, un radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, tinción inmunohistoquímica, o transferencia de Western), un procedimiento bioquímico (tal como un ensayo enzimático), y un procedimiento de biología molecular para medir un ARNm.

20 Cuando se usa un procedimiento inmunológico en el análisis de ADAMTS13, puede prepararse un anticuerpo anti-ADAMTS13 de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como un procedimiento descrito en el documento WO 2004/029242. Cada inmunoensayo puede realizarse de acuerdo con, por ejemplo, el documento WO 2004/029242.

30 Como procedimiento de medición de una concentración de ADAMTS13, un procedimiento inmunológico es preferible desde el punto de vista de la sensibilidad y la conveniencia. El procedimiento inmunológico significa un procedimiento de análisis de ADAMTS13 mediante un procedimiento ELISA, un procedimiento en látex, o inmunocromatografía, usando un anticuerpo contra ADAMTS13. Como procedimiento inmunológico, puede mencionarse, por ejemplo, un procedimiento competitivo que usa un ADAMTS13 marcado, un procedimiento de "sándwich" que usa un anticuerpo marcado, un procedimiento de perlas de látex en el que se observa una aglutinación de perlas recubiertas de un anticuerpo, y un procedimiento que usa un anticuerpo conjugado a una partícula coloreada tal como un coloide de oro. Cualquier procedimiento que usa el anticuerpo contra ADAMTS13 está incluido en realizaciones preferidas de la presente invención. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Puede usarse cualquier fragmento de anticuerpo, tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv.

35 La actividad enzimática de ADAMTS13 puede medirse mediante, por ejemplo, un procedimiento que utiliza una electroforesis en SDS-agarosa [Furlan M. et al., Blood, (Estados Unidos), 1997, vol. 89, p. 3097-3103]; un procedimiento ELISA que usa un antígeno recombinante del dominio A2 de vWF, como sustrato de la proteasa de escisión de vWF [Whitelock JL et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis, (Reino Unido), 2004, vol. 2, p. 485-491]; o un procedimiento que usa un sustancia fluorescente inactivada FRET-VWF73, preparada introduciendo un grupo fluorescente [2-(N-metilamino)benzoilo, Nma] y un grupo extintor de la fluorescencia (2,4-dinitrofenilo, Dnp) en un péptido sintético correspondiente a 73 residuos de ASP1596-Arg1668 situados en el dominio A2 de vWF, como sustrato de la proteasa de escisión de vWF [Kokame K. et al, British Journal of Haematology, (Reino Unido), 2005, vol. 129, p. 93-100]. Además, puede usarse un procedimiento descrito en la memoria descriptiva de la Solicitud de Patente Japonesa N° 2005-148793, es decir, un procedimiento de análisis que comprende las etapas de (1) en un líquido, poner a una muestra que posiblemente contiene ADAMTS13 en contacto con un sustrato inmovilizado preparado uniendo vWF o un fragmento del mismo a un portador insoluble, (2) separar el líquido del portador insoluble, y (3) analizar el vWF o el fragmento del mismo que queda en el portador insoluble, y/o un fragmento de vWF que está liberado del portador insoluble y está contenido en el líquido.

40 La concentración de vWF puede medirse mediante, por ejemplo, un procedimiento de medición de una actividad usando una actividad de agregación de plaquetas humanas y un cofactor de ristocetina [Allain JP et al., J. Lab. Clin. Med., (Estados Unidos), 1975, vol. 85, p. 318-328]; o un inmunoensayo usando un anticuerpo anti-vWF [Brown JE et al., Thromb. Res., (Estados Unidos), 1986, vol. 43, p. 303-311]. El inmunoensayo es preferible desde el punto de vista de la sensibilidad y la conveniencia.

### Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación mediante, pero no está limitada en absoluto a, los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Mediciones de los niveles de marcador de coagulación y fibrinólisis en pacientes con CID y pacientes con PTT

5 Muestras de plasma citratado al 3,8 % se recogieron de pacientes con CID (n = 23) y pacientes con PTT (n = 2). Los niveles de marcador excepto para un número de plaquetas se midieron con LPIA-NV7 (Mitsubishi Kagaku Iatron) usando kits disponibles en el mercado (serie LPIA; Mitsubishi Kagaku Iatron). Se recogieron muestras de plasma citratado al 3,2 %, y un número de plaquetas se midió con KX-21 (Sysmex).

10 Los resultados de las mediciones se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 1, PAI-1 significa un inhibidor del activador de plasminógeno-1, D-D significa dímero-D, Fbg significa fibrinógeno, FDP-P significa FDP de plasma, PLT significa plaquetas, y TAT significa un complejo trombina/antitrombina III. Los pacientes a los que se les diagnosticó CID incluían pacientes con un número de plaquetas notablemente reducido, pero estos pacientes no podían distinguirse de pacientes con PTT, en base solamente a niveles de marcador de coagulación y fibrinólisis convencional.

Tabla 1

	Diagnóstico	PIC	PAI-1	D-D	Fbg	FDP-P	PLT	TAT
		µg/ml	ng/ml	µg/ml	mg/dl	ng/ml	X10 <sup>4</sup> /µl	ng/ml
Paciente 1	PTT	1,1	39,7	3,6	204	2,5	2,0	-
Paciente 2	PTT	4,2	10,7	6,7	-	-	0,9	-
Paciente 3	CID	4,9	924,5	>2000	197	261,5	1,2	48,1
Paciente 4	CID	2,0	55,7	1000-2000	445	64,1	-	5,6
Paciente 5	CID	2,4	220,7	>2000	838	49,2	0,5	12,9
Paciente 6	CID	1,3	70,4	500-1000	433	27,5	-	3,4
Paciente 7	CID	3,0	25,2	1000-2000	413	17,9	-	-
Paciente 8	CID	4,4	228,3	33,7	26	189,0	-	57,4
Paciente 9	CID	0,6	40,1	<200	703	4,5	1,2	
Paciente 10	CID	1,0	28,1	12,1	165	24,8	-	7,6
Paciente 11	CID	0,5	69,4	<200	360	2,7	-	1,4
Paciente 12	CID	-	25,6	1,1	388	3,4	-	-
Paciente 13	CID	0,7	-	1,5	194	1,7	-	1,9
Paciente 14	CID	4,6	105,6	>2000	423	24,1	10,4	32,5
Paciente 15	CID	1,1	29,1	500-1000	401	6,7	-	1
Paciente 16	CID	4,1	178,0	>2000	176	-	13,4	7,6
Paciente 17	CID	1,3	16,2	2,1	680	9,8	-	2
Paciente 18	CID	6,7	31,6	>2000	342	59,9	3,5	4,4
Paciente 19	CID	0,7	23,8	<200	416	2,0	-	1,4
Paciente 20	CID	-	1091,2	15,0	432	13,7	0,2	-
Paciente 21	CID	3,4	53,5	1000-2000	260	15,7	1,8	9,6
Paciente 22	CID	-	162,2	200-500	307	5,7	22,9	-
Paciente 23	CID	-	-	>2000	632	51,0	25,4	-
Paciente 24	CID	31,6	17,9	22,1	126	55,9	1,1	-
Paciente 25	CID	7,6	22,4	33,8	340	28,9	5,2	-

Ejemplo 2: Análisis de la cantidad de antígeno de ADAMTS13, actividad enzimática de ADAMTS13, y cantidades del antígeno de vWF en pacientes con CID y pacientes con PTT

Se recogieron muestras de plasma citratado al 3,8 % de personas sanas (n = 12), pacientes que padecían CID (n = 23) y pacientes que padecían PTT (n = 2). A este respecto, a los pacientes de CID se les diagnosticó CID de acuerdo con los criterios de diagnóstico para CID como se han descrito anteriormente, y a los pacientes de PTT se les diagnosticó PTT de acuerdo con descubrimiento clínicos. La cantidad (Aag) de un antígeno de ADAMTS13 se determinó usando un kit disponible en el mercado (kit de ELISA ADAMTS-13; Mitsubishi Kagaku Iatron). La actividad enzimática (Aact) de ADAMTS13 se determinó mediante una electroforesis SDS-gel de agarosa [Furlan M. et al., Blood, (Estados Unidos), 1997, vol. 89, p. 3097-3103]. La cantidad (Vag) de un antígeno de vWF se determinó usando un kit disponible en el mercado (STA LIAtest: Roche Diagnostics). Los resultados de las mediciones se muestran en la Tabla 2. En la Tabla 2, Aag y Aact se indican como un porcentaje, con el promedio de valores obtenidos en personas sanas (n = 12) considerado como el 100 %. Vag se indica como un porcentaje con respecto a al patrón (persona normal) contenido en el kit.

Tabla 2

		Diagnóstico	Aag	Aact	Aag/ Aact	Vag	Vag/Aag	Vag/ Aact	Categoría
			%	%		%			
Grupo posiblemente con PTT	Paciente 1	PTT	14,3	3,0	4,8	125,5	8,7	41,8	PTT
	Paciente 2	PTT	32,2	15,1	2,1	340,8	10,6	22,5	
	Paciente 3	CID	17,3	6,8	2,5	214,7	12,4	31,4	Grupo 1
	Paciente 4	CID	12,3	7,9	1,6	195,2	15,9	24,7	
	Paciente 5	CID	8,9	9,4	1,0	170,0	19,0	18,1	
	Paciente 6	CID	8,3	3,0	2,8	175,5	21,1	58,5	
	Paciente 7	CID	21,9	3,0	7,3	237,0	10,8	79,0	
	Paciente 8	CID	24,4	8,8	2,8	210,8	8,6	23,9	
	Paciente 9	CID	56,0	3,0	18,7	271,8	4,9	90,7	Grupo 2
	Paciente 10	CID	42,3	6,2	6,9	239,8	5,7	38,9	
	Paciente 11	CID	28,7	8,8	3,3	182,4	6,4	20,7	
	Paciente 12	CID	44,0	15,0	2,9	216,9	4,9	14,4	
	Paciente 13	CID	35,7	12,8	2,8	180,7	5,1	14,1	Grupo 3
	Paciente 14	CID	24,6	10,8	2,3	140,8	5,7	13,1	
Grupo irrelevante respecto a PTT	Paciente 15	CID	76,5	94,4	0,8	56,6	0,7	0,6	Grupo 3
	Paciente 16	CID	59,0	107,1	0,6	124,7	2,1	1,2	
	Paciente 17	CID	72,0	53,1	1,4	169,0	2,3	3,2	
	Paciente 18	CID	41,7	20,9	2,0	111,4	2,7	5,3	
	Paciente 19	CID	61,7	59,4	1,0	218,4	3,5	3,7	

(continuación)

		Diagnóstico	Aag	Aact	Aag/ Aact	Vag	Vag/Aag	Vag/ Aact	Categoría
			%	%		%			
	Paciente 20	CID	56,2	75,0	0,7	214,8	3,8	2,9	
	Paciente 21	CID	35,2	20,9	1,7	161,2	4,6	7,7	
	Paciente 22	CID	41,1	19,5	2,1	198,9	4,8	10,2	
	Paciente 23	CID	23,7	33,3	0,7	186,8	7,9	5,6	
	Paciente 24	CID	79,5	833,5	1,0	172,7	2,2	2,1	
	Paciente 25	CID	77,3	67,9	1,1	226,0	2,9	3,3	
	Sano 1		102,1	100	1,0	80,2	0,8	0,8	
	Sano 2		96,3	90	1,1	101,5	1,1	1,1	
	Sano 3		110,5	100	1,1	83,8	0,8	0,8	
	Sano 4		78,1	100	0,8	46,4	0,6	0,5	
	Sano 5		89,5	100	0,9	102,2	1,1	1,0	
	Sano 6		96,4	115	0,8	90,6	0,9	0,8	
	Sano 7		134,2	100	1,3	87,5	0,7	0,9	
	Sano 8		90,9	100	0,9	111,3	1,2	1,1	
	Sano 9		90,1	100	0,9	126,5	1,4	1,3	
	Sano 10		111,2	100	1,1	115,6	1,0	1,2	
	Sano 11		110,7	120	0,9	118,2	1,1	1,0	
	Sano 12		106,5	135,5	0,8	78,7	0,7	0,6	

5 Los valores medidos obtenidos de los pacientes con CID se clasificaron de acuerdo con las siguientes indicaciones, en base a los valores medidos obtenidos de los pacientes de PTT. En primer lugar, los pacientes en los que dos o tres puntos de entre los siguientes puntos 1) a 3) se aplican se clasificaron en un "grupo de pacientes de CID que posiblemente padecen PTT (grupo A)", y los otros se clasificaron en un "grupo de pacientes de CID que posiblemente no padecen PTT (grupo B)".

10 1) La cantidad (Aag) del antígeno de ADAMTS13 es el 30 % o menos.  
 2) La actividad enzimática (Aact) de ADAMTS13 es el 15 % o menos.  
 3) La proporción (Aag/Aact) de la cantidad de ADAMTS13 con respecto a la actividad de ADAMTS13 es de 2,0 o más. Estos grupos de pacientes (grupo A y grupo B) se clasificaron adicionalmente en los tres grupos siguientes:

15 Grupo 1: Vag/Aag es 8 o más, y Vag/Aact es 16 o más.  
 Grupo 2: Vag/Aag es 8 o menos, y Vag/Aact es 16 o más.  
 Grupo 3: Diferentes de los grupos 1 y 2 (es decir, Vag/Aact es menor de 16.)

Cada grupo de pacientes se comparó con personas sanas, para obtener los resultados como se muestran en de la figura 1 a la figura 3. Como se muestra en los resultados de la cantidad (Aag) del antígeno de ADAMTS13, la

5 actividad enzimática (Aact) de ADAMTS13, y la cantidad (Vag) del antígeno de vWF, se observaron diferencias evidentes entre el grupo de PTT y el grupo de personas sanas con respecto a cada marcador. Además, las diferencias entre el grupo de PTT y el Grupo 3 se observaron con respecto a la cantidad del antígeno de ADAMTS13 y la actividad enzimática de ADAMTS13, y ambos grupos podían diferenciarse entre sí. El Grupo 2 podía distinguirse del grupo de PTT en la cantidad del antígeno de ADAMTS13, pero no podía distinguirse del grupo de PTT en la actividad enzimática de ADAMTS13. Con respecto a la cantidad del antígeno de vWF, no se observaron diferencias entre el grupo de PTT y los grupos de CID (Grupo 1 a Grupo 3).

10 En base a los anteriores resultados, el grupo de PTT y los grupos de CID clasificados en tres subgrupos se compararon en Vag/Aag y Vag/Aact, para obtener los resultados mostrados en la figura 4 y la figura 5, respectivamente.

15 Cuando se usó la proporción (Vag/Aag) de la cantidad del antígeno de vWF con respecto a la cantidad del antígeno de ADAMTS13, o la proporción (Vag/Aact) de la cantidad del antígeno de vWF con respecto a la actividad de ADAMTS13, los valores medios del Grupo 1 y el Grupo 2 eran menores que dos veces el del grupo de PTT, pero cada mediana del Grupo 3 mostraba una reducción de dos veces o mayor en comparación con la del grupo de PTT. A partir de este resultado se llegó a la conclusión de que el Grupo 3 era una enfermedad aparentemente diferente de PTT.

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La presente invención puede aplicarse al uso para un tratamiento apropiado de CID.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para seleccionar un paciente al que se le va a diagnosticar púrpura trombocitopénica trombótica de entre pacientes a los que se les diagnosticó coagulación intravascular diseminada, **caracterizado por** el análisis de la proporción de la cantidad de un factor de von Willebrand con respecto a la cantidad y/o la actividad enzimática de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, en el que la proteasa de escisión del factor de von Willebrand es ADAMTS13, en una muestra de un paciente al que se le ha diagnosticado coagulación intravascular diseminada.
- 5 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteasa de escisión del factor de von Willebrand se analiza inmunológicamente.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la cantidad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand se determina usando un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteasa de escisión del factor de von Willebrand y en el que la proteasa de escisión del factor de von Willebrand es ADAMTS13.

Figura 1

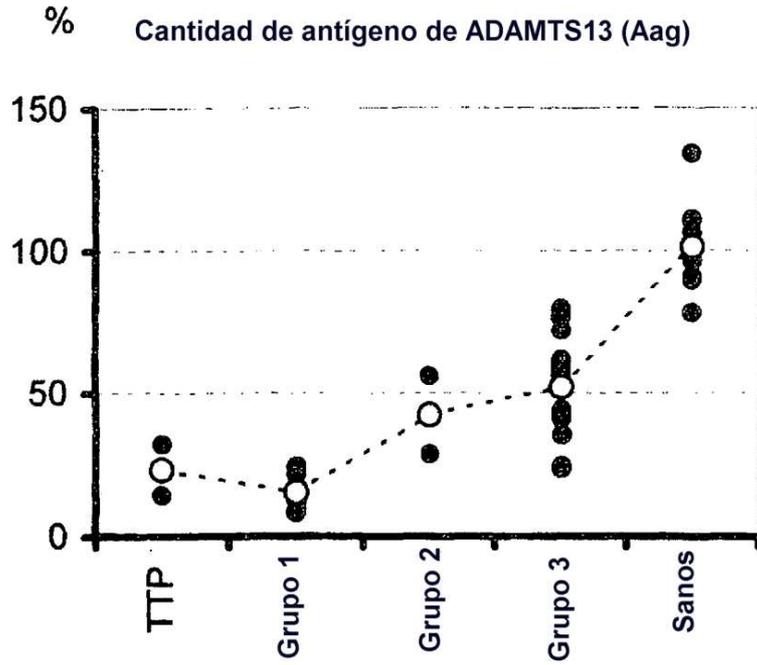


Figura 2

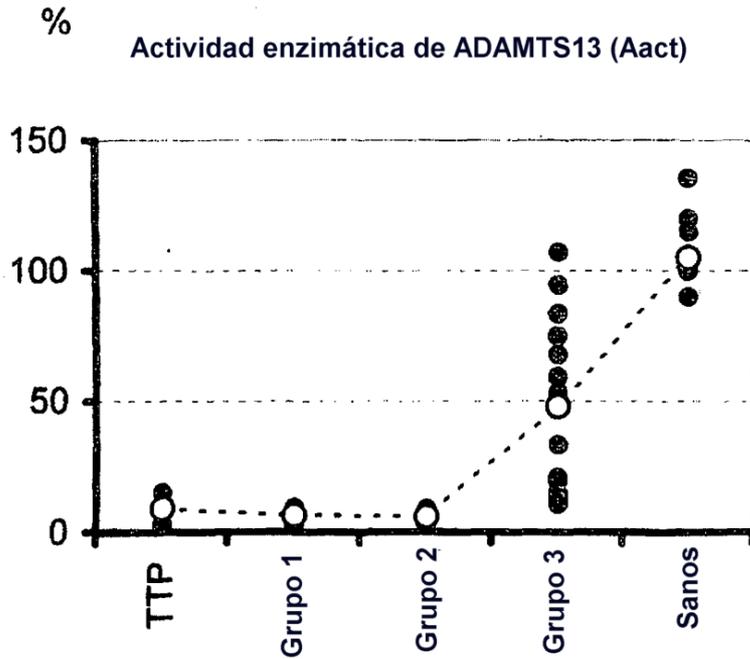


Figura 3

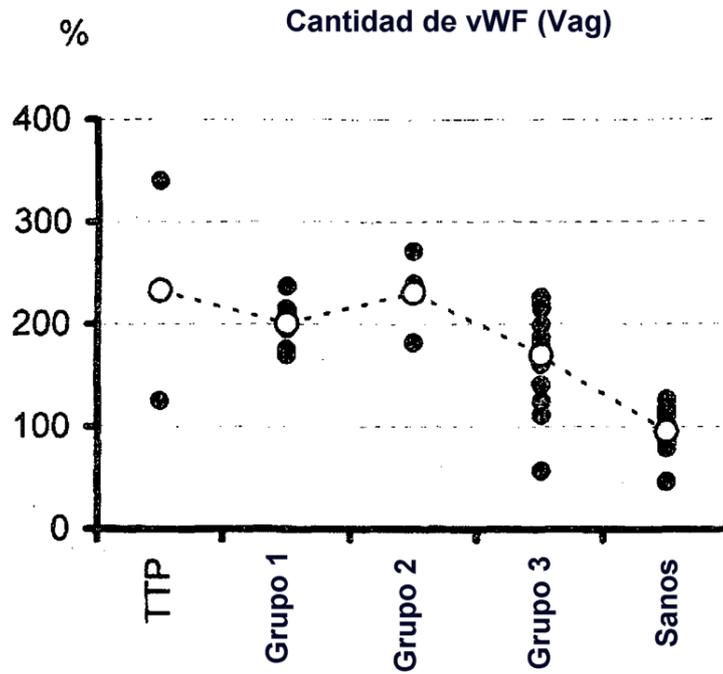


Figura 4

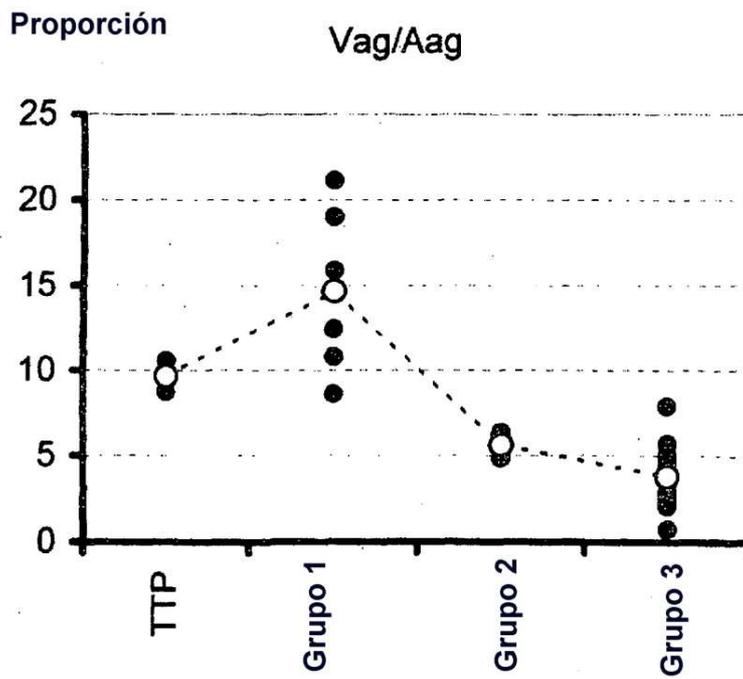


Figura 5

