

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 574**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07714227 .1**
96 Fecha de presentación: **15.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1990421**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Procedimiento de detección de afección en paciente con alteración de la consciencia**

30 Prioridad:
16.02.2006 JP 2006039567

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.08.2012

73 Titular/es:
Mitsubishi Chemical Medience Corporation
2-8, Shibaura 4-chome Minato-ku
Tokyo 108-8559, JP

72 Inventor/es:
IGAMI, Ko;
OKAZAKI, Tomoharu;
SHINMYOZU, Koichi;
ONO, Tomoko y
FURUSAKI, Fumio

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 386 574 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 de detección de afección en paciente con alteración de la consciencia

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a un procedimiento para la detección (determinación o diagnóstico) de una afección en un paciente con alteración de la consciencia (de forma particular, un paciente inconsciente tal como un paciente con estupor o coma). De acuerdo con la presente descripción se puede juzgar el grado real de gravedad, o se puede predecir la gravedad un en futuro, analizando (preferiblemente midiendo de forma cuantitativa) la cantidad (concentración) y/o actividad del enzima de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand (en lo sucesivo denominada como vWF) contenida en una muestra biológica (por ejemplo, sangre) tomada de un sujeto.

10 **Técnica anterior**

15 La apoplejía era, antes de 1980, la principal causa de muerte en este país, pero ha disminuido en un factor de aproximadamente 4 durante los últimos 20 años, debido al progreso en la tecnología médica y al desarrollo de cuidados médicos de emergencia. Sin embargo, en la actualidad un rápido avance de una sociedad en envejecimiento tiende a aumentar de nuevo el número de pacientes con apoplejía. Para la prevención de la misma es importante el cuidado diario de la salud. Además se puede prolongar la vida del paciente determinando exactamente la causa de alteración de la consciencia en una fase temprana de estupor o coma provocado por apoplejía o similares, y seleccionando una o más opciones apropiadas (un tratamiento, valoración de pronóstico o similares).

20 Las apoplejías son trastornos cerebrales provocados por anomalías en los vasos sanguíneos (un trastorno paroxismal en el que el vaso sanguíneo cerebral se rompe u obstruye debido a una determinada causa). Es importante un pronto y apropiado tratamiento debido a que la apoplejía pone en peligro la vida o deja secuelas tales como parálisis o logopatía. Las apoplejías se pueden clasificar en dos categorías principales: hemorragia debida a la ruptura de un vaso sanguíneo cerebral e isquemia debido al bloqueo de un vaso sanguíneo cerebral. Las apoplejías hemorrágicas incluyen hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral, y apoplejías isquémicas incluyen infarto cerebral y ataque isquémico transitorio.

25 El infarto cerebral, provocado por el bloqueo de una arteria cerebral por un trombo, es el tipo principal de apoplejía que es la tercera causa de muerte en Japón, y presenta una alta tasa de mortalidad. El infarto cerebral es un estado en el que una arteria cerebral se obstruida debido a una determinada causa y, como consecuencia, el flujo sanguíneo hasta los tejidos subsiguientes se altera o reduce. Aproximadamente el 20% de todas las causas de muerte son enfermedades cerebrovasculares, y el infarto cerebral llega a aproximadamente el 50% de estas enfermedades. Los infartos cerebrales se pueden clasificar en dos categorías principales: embolia cerebral y trombosis cerebral. La embolia cerebral no es provocada directamente por anomalías en las arterias cerebrales, pero es provocada por un agregado (tal como sangre, proteínas, lípido, que se forma en el corazón, debido a una enfermedad coronaria, se acelera hasta arterias cerebrales y bloquea la arteria cerebral. Por el contrario la trombosis cerebral se desarrolla debido a la arteriosclerosis de las arterias cerebrales por sí mismas. La trombosis cerebral es más frecuente que la embolia cerebral.

40 Al igual que la apoplejía, las causas de estupor o coma incluyen, por ejemplo, el daño del tronco cerebral debido a lesión de cabeza, alcoholismo, una sobredosis de un fármaco tal como un sedante, paro cardíaco, aneurisma, una enfermedad pulmonar grave, inhalación de monóxido de carbono, ictus epiléptico, hipotiroidismo, disfunción hepática, disfunción renal, hipoglucemia provocada por diabetes. Por tanto son necesarios muchos exámenes para tomar una decisión precisa. Por ejemplo, se pueden comprobar niveles de sangre en azúcar, sodio, alcohol, oxígeno, dióxido de carbono, conteo de glóbulos rojos y células de glóbulos blancos, o azúcar y sustancias tóxicas en orina. Además se puede medir la troponina o una proteína de unión de ácidos grasos específica del corazón (H-FABP) para determinar si el estupor o coma en un paciente es provocado por infarto de miocardio, y se puede seleccionar un tratamiento apropiado. Sin embargo ejemplos de un procedimiento de diagnóstico para arteriosclerosis como una causa de trombosis cerebral incluye exámenes no invasivos tales como fundoscopia, CT de rayos X, MRI, un procedimiento de velocidad de onda pulsante, o control de flujo sanguíneo usando una onda ultrasónica, y exámenes invasivos, tales como angiografía, angioscopia, o análisis por ultrasonidos intravascular. Estos procedimientos son insuficientes para controlar la extensión de enfermedad vascular arteriosclerótica o el progreso de sus síntomas.

50 Se ha sugerido que una proteasa de escisión del factor de von Willebrand (en lo sucesivo designado como vWF) [en adelante denominado como ADAMTS13 (otro nombre de la proteasa de escisión de vWF)] está implicada en el comienzo de la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) que es muy grave y presenta una elevada tasa de mortalidad; la proteasa de escisión de vWF se purificó a partir de plasma (referencia no patente 1); y se identificó el gen mediante clonación con ADNc. Se ha revelado actualmente que mutaciones genéticas de ADAMTS13 reducen de forma reseñable la actividad de escisión de vWF (referencia no patente 2). Se desarrolló recientemente un

5 inmuensayo de enzima que usa anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de ADAMTS13 (referencia de patente 1), y se estableció un procedimiento para la detección de causas de trombosis implicadas en la agregación de las plaquetas, y se estableció el grado de trombofilia en trombosis. Este procedimiento se usó para encontrar que las concentraciones de ADAMTS13 contenidas en muestras de plasma recogidas de pacientes con trombosis eran significativamente reducidas en comparación con las de personas sanas.

10 Por ejemplo, la referencia de patente 2 divulga un procedimiento para la detección de trombosis o el grado de trombofilia, caracterizado por medida de ADAMTS13, y describe que ejemplos de trombosis incluyen 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. Además la referencia de patente 3 describe un procedimiento de detección de trombosis de plaqueta o disfunción de órgano en un paciente que sufre de coagulación intravascular diseminada (DIC) o síndrome de respuesta inflamatoria sistémico (SIRS), analizando ADAMTS13 y/o un factor de escisión del mismo (tal como elastasa, plasmina o trombina).

15 Como un procedimiento convencional para la determinación de la actividad de ADAMTS13 se usó un procedimiento de detección de multímeros de vWF grandes, usando una combinación de una electroforesis en SDS-agarosa, y autorradiografía en Western blotting (referencia no patente 3). Además se desarrolló FRET-VWF73 que se prepara introduciendo un grupo fluorescente y un grupo interruptor en 73 residuos del dominio A2 (es decir, los sitios de escisión específicos por ADAMTS13) de vWF, y permitió que se llevara a cabo de forma conveniente la medida de la actividad de ADAMTS13 (referencia no patente 4).

20 [Referencia de patente 1] WO 2004/029242

[Referencia de patente 2] WO 2005/062054

[Referencia de patente 3] WO 2006/049300

[Referencia no patente 1] K. Fujikawa y col., Blood, (EEUU), 2001, vol. 98, p.1662-6

[Referencia no patente 2] G. G. Levy y col., Nature, (Reino Unido), 2001, vol. 413, p. 488-494

25 [Referencia no patente 3] M.Furlan y col., Blood, (EEUU), 1996, vol. 87, p. 4223-4234

[Referencia no patente 4] Kokame K y col., The British Journal of Haematology, (United Kingdom), 2005, vol. 129, p. 93-100

Divulgación de la invención

Problemas a resolver

30 Como se describió anteriormente el estupor o coma es provocado por distintos orígenes y es importante para determinar una causa para cada paciente en una fase temprana. De forma particular hay varios procedimientos de examen para diagnosticar arteriosclerosis que es una causa de trombosis cerebral en un paciente con enfermedad cerebrovascular, pero estos procedimientos son insuficientes para controlar la extensión de enfermedad vascular arteriosclerótica o el progreso de sus síntomas. Además no se clarifican mecanismos y factores para el progreso hacia una afeción acompañada por el comienzo de alteración de la consciencia y/o fallo multiorgánico, y por tanto, el pronóstico de muchos pacientes era muy pobre. En pacientes con enfermedad cerebrovascular se da la posibilidad de proteger frente a afecciones de progreso hacia gravedad incluyendo fallo multiorgánico, mediante detección prematura de un paciente que posiblemente recaiga en tales síntomas graves y tratamiento del paciente con una terapia apropiada en una fase prematura.

40 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos y han encontrado que ADAMTS13 se puede analizar en un paciente con estupor o coma (tal como un paciente con apoplejía) para determinar una afeción en el paciente o predecir el progreso hacia síntomas graves. De forma más particular los inventores midieron la concentración y/o actividad de ADAMTS13 en plasma recogido de un paciente con enfermedad cerebrovascular y encontraron que la concentración de ADAMTS13 se reducía de acuerdo con la extensión de la enfermedad vascular arteriosclerótica.

45 Adicionalmente en casos de hepatopatía grave los inventores descubrieron recientemente que un paciente con una concentración y actividad notablemente reducida de ADAMTS13 desembocaba en síntomas graves acompañados de alteración de la consciencia y fallo multiorgánico. Como consecuencia, los inventores han encontrado que las medidas de la misma son útiles en la predicción de la gravedad y el control de pronóstico, y complementaron la presente descripción.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento y kit para la detección de una afección en un paciente con alteración de la consciencia.

Medios para solventar los problemas

5 La invención se refiere a un procedimiento in vitro para la detección o predicción de la gravedad de una enfermedad cerebrovascular en un paciente con alteración de la consciencia, en el que se analiza la cantidad y/o actividad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand y en el que dicha enfermedad cerebrovascular se selecciona del grupo constituido por infarto cerebral aterotrombótico, infarto cerebral cardioembólico e infarto cerebral lacunar.

10 La invención se refiere a realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

El objeto se puede resolver mediante la presente descripción, es decir, un procedimiento para la detección de una afección en un paciente con alteración de la consciencia, caracterizado porque se analiza la cantidad y/o actividad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand.

15 De acuerdo con una realización preferida del procedimiento la detección de una afección es una detección de enfermedad cerebrovascular, una detección de enfermedad vascular arteriosclerótica, o una detección o predicción de gravedad.

De acuerdo con otra realización preferida del procedimiento la cantidad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand se analiza mediante un procedimiento inmunológico usando un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteasa de escisión del factor de von Willebrand.

20 De acuerdo con otra realización preferida del procedimiento la actividad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand se analiza usando un factor de von Willebrand o un fragmento del mismo.

Adicionalmente, la presente descripción se refiere a un kit para la detección de una afección en un paciente con alteración de la consciencia, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de forma específica a una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, o un factor de von Willebrand o un fragmento del mismo.

25 De acuerdo con una realización preferida del kit la detección de una afección es una detección de enfermedad cerebrovascular una detección de enfermedad vascular arteriosclerótica o una detección o predicción de gravedad.

El término “análisis” tal como se usa en esta invención incluye una detección para determinar una presencia o ausencia de una sustancia (por ejemplo, ADAMTS13) que se va a analizar, y una medida para determinar de forma cuantitativa o semi-cuantitativa la cantidad (concentración) o actividad de una sustancia que se va a analizar.

30 La expresión “detectar (determinar) una(s) afección(es)” tal como se usa en esta invención incluye, por ejemplo, detectar o predecir una presencia o ausencia, o la extensión de enfermedad cerebrovascular, para detectar o predecir la gravedad de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tales como alteración de consciencia, fallo multiorgánico y hepatopatía)], para predecir el comienzo (es decir, para evaluar el riesgo de comienzo) de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tales como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico y hepatopatía)], para llevar a cabo un pronóstico de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tal como alteración de consciencia, fallo multiorgánico, y hepatopatía)], un control, una decisión de un tratamiento.

Efectos de la invención

40 De acuerdo con la presente descripción se puede juzgar la gravedad actual o se puede predecir la gravedad en el futuro en un paciente con alteración de la consciencia.

Por ejemplo, en un paciente con alteración de la consciencia (por ejemplo, un paciente con enfermedad cerebrovascular), se puede encontrar prematuramente un paciente que posiblemente caiga en síntomas graves acompañados del comienzo de la alteración de la consciencia y/o fallo multiorgánico y por tanto el valor clínico de la presente descripción es considerado extremadamente alto.

45 De acuerdo con la presente descripción se puede detectar la alteración de la consciencia y/o fallo multiorgánico de forma conveniente, rápida y específica. Adicionalmente a partir de los ejemplos descritos a continuación se puede sugerir “una disminución notable en ADAMTS13” como un nueva causa de comienzo de fallo multiorgánico o alteración de la consciencia y se considera que el progreso de los síntomas se puede evitar con un tratamiento para aumentar o mantener ADAMT13 [por ejemplo, una transfusión de plasma recién congelado (FFP), un intercambio de plasma, que no se ha usado previamente en el tratamiento de tales pacientes. Esto muestra que un control de ADAMTS13 se puede

usar directamente en la evaluación de los efectos del tratamiento anterior para pacientes con infarto cerebral.

Breve descripción de los dibujos

La figura es una fotografía, en lugar de un dibujo, que muestra el resultado de la electroforesis en gel de SDS-agarosa de vWF tratado con un suero reunido humano normal y una serie de dilución del mismo, que contiene ADAMTS13.

5 La figura 2 es una curva estándar preparada a partir del modelo electroforético mostrado en la figura 1.

La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de un análisis estadístico de las cantidades de un antígeno de ADAMTS13 en casos de infarto cerebral aterotrombótico.

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de un análisis estadístico de las cantidades de un antígeno de ADAMTS13 en casos de infarto cerebral lacunar.

10 La figura 5 es un gráfico que muestra el progreso clínico del caso nº 1 en el ejemplo 3.

Mejor modo

[1] Procedimiento de detección de la presente descripción

15 En el procedimiento de la presente descripción se puede detectar una afección en un paciente con alteración de la consciencia analizando (preferiblemente midiendo o determinando cuantitativamente) al menos uno entre la cantidad (concentración) y actividad del enzima de ADAMTS13, y comparando el(los) valor(es) medido(s) con uno(s) entre persona sana o mediante medida o determinación cuantitativa de la cantidad (concentración) y la actividad del enzima de ADAMTS13 secuencialmente.

El procedimiento de la presente descripción puede comprender

20 (1) la etapa de analizar la cantidad (concentración) de actividad del enzima de ADAMTS13 en una muestra que se va analizar, y

(2) la etapa de comparar el(los) valor(es) obtenidos con uno(s) de una o más personas sanas.

De forma alternativa el procedimiento de la presente descripción puede comprender

(1) la etapa de analizar secuencialmente la cantidad (concentración) o actividad del enzima de ADAMTS13 en una muestra que se va a analizar, y

25 (2) la etapa de caracterizar una tendencia de la evolución en el tiempo obtenida.

La expresión “proteasa de escisión del factor de von Willebrand (proteasa de escisión de vWF)” tal como se usa en esta invención significa una metaloproteasa, a veces denominada como ADAMTS13, que escinde de forma específica el factor de von Willebrand (vWF) en la unión entre tirosina (842) y metionina (843) contenida en un dominio A2 del mismo.

30 En el procedimiento de la presente divulgación se puede usar una reducción en la cantidad (concentración) y/o actividad del enzima de ADAMTS13 como un índice, en comparación con las personas sanas. Adicionalmente en el procedimiento de la presente descripción se puede medir una evolución en el tiempo de la cantidad (concentración) y/o actividad del enzima de ADAMTS13 para usar una tendencia en decrecimiento obtenida de la evolución en el tiempo como un índice. Por ejemplo, en un paciente que avance hacia una afección acompañada del comienzo de alteración de consciencia y/o fallo multiorgánico, como se muestra en los ejemplos descritos a continuación, se había reducido de forma notable la concentración y actividad del enzima de ADAMTS13 contenida en un fluido corporal, incluso antes del progreso hacia la anterior afección, en comparación con la persona sana.

40 En el procedimiento de la presente divulgación, cuando la concentración y/o actividad del enzima de ADAMTS13 medidos o determinados cuantitativamente son menores que los intervalos normales de personas sanas (por ejemplo, inferiores a los valores umbral), o cuando una evolución en el tiempo de la concentración y/o actividad del enzima de ADAMTS13 se mide o se determina cuantitativamente, y la evolución en el tiempo muestra una tendencia a la baja, se puede juzgar que un sujeto sufre de enfermedad cerebrovascular (o la probabilidad de enfermedad cerebrovascular es alta), o se puede predecir que el riesgo de comienzo de enfermedad cerebrovascular es alto. Adicionalmente se puede juzgar que la gravedad de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tales como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico, y hepatopatía)] es alta, se puede predecir que el riesgo de comienzo de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tales como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico,

y hepatopatía] es alto, y se puede predecir que el pronóstico de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tales como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico y hepatopatía] es bajo.

5 Por el contrario, cuando la concentración y/o actividad del enzima de ADAMTS13 se encuentra dentro de los intervalos normales o cuando se mide o determina cuantitativamente una evolución en el tiempo de la concentración y/o actividad del enzima de ADAMTS13, y la evolución en el tiempo muestra una tendencia al alza, puede juzgarse que un sujeto no sufre de enfermedad cerebrovascular (o la probabilidad de enfermedad cerebrovascular es baja), o se puede predecir que el riesgo de comienzo de enfermedad cerebrovascular es bajo. Adicionalmente se puede juzgar que la gravedad de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tal como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico y hepatopatía)] es baja, se puede predecir que el riesgo de comienzo de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tal como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico, y hepatopatía)] es bajo, y se puede predecir que el pronóstico de diversos síntomas [por ejemplo, enfermedad cerebrovascular y/o otras complicaciones (tales como alteración de la consciencia, fallo multiorgánico y hepatopatía)] es bajo.

15 Ejemplos de un sujeto al que se puede aplicar el procedimiento de la presente descripción (es decir, una persona que se va a diagnosticar) incluyen un paciente con alteración de la consciencia, en particular se prefiere un paciente no consciente tal como un paciente con estupor o coma, y un paciente con enfermedad cerebrovascular (un paciente con apoplejía).

20 Ejemplos de enfermedad cardiovascular incluyen ataque isquémico transitorio, infarto cerebral aterotrombótico, infarto cerebral cardioembólico, infarto cerebral lacunar, hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, demencia cerebrovascular, y encefalopatía hipertensiva. Ejemplos de hepatopatía incluyen hepatitis viral aguda, hepatitis viral crónica, hepatitis autoinmune, hepatopatía alcohólica, cirrosis, cirrosis biliar primaria, carcinoma hepatocelular, y hepatopatía inducida por fármacos. La enfermedad arteriosclerótica es una afección que tiene lugar principalmente en la aorta, arteria coronaria, arteria cerebral, o arteria carótida, y es un factor principal de infarto de miocardio, infarto cerebral. Se considera que la formación de placas ateroscleróticas comienza debido al daño de las células del endotelio vascular; agregación y adhesión de plaquetas en el sitio dañado, migración de células del músculo liso vascular a la túnica íntima y proliferación de células de músculo liso, migración de macrófagos a plaquetas agregadas, formación de las placas arterioscleróticas (ateromas) debido a la transformación de células de músculo liso o macrófagos en células espumosas e induración debido a que tiene lugar adsorción de colágeno; y se completan las plagas arterioscleróticas. Las placas ateroscleróticas son estructuralmente frágiles, y se rompen con una fuerza hemodinámica como un desencadenante, para formar rápidamente un trombo mediante reacciones de factores tisulares y factores de coagulación sanguínea. Los factores de riesgo de enfermedad vascular arteriosclerótica incluyen alta presión sanguínea, hiperlipidemia, tabaquismo, obesidad, gota, estrés, un estilo de vida sedentario, modelo comportacional de tipo A y concentraciones bajas en suero de colesterol HDL. Debido al aumento en tales enfermedades relacionadas con el estilo de vida las enfermedades cerebrovasculares, infarto cerebral aterotrombótico e infarto cerebral cardioembólico van en aumento. En las enfermedades cerebrovasculares, estas enfermedades debidas a enfermedades vasculares arterioscleróticas son infarto cerebral isquémico. Ejemplos de los mismos incluyen infarto cerebral aterotrombótico provocado por estenosis arterial u oclusión debido a la formación de ateroma en la parte cervical de la arteria carótida interna o la parte horizontal de la arteria cerebral media; embolismo arterial debida a arteriosclerosis en un vaso sanguíneo relativamente delgado tal como la arteria carótida común en el cuello; infarto cerebral cardioembólico debido a la oclusión súbita de la arteria carótida interna o arteria cerebral por una migración de un trombo de fibrina (que se forma en la cavidad cardiaca debido a disritmia cardiaca o similares provocada por enfermedad coronaria) y acompañada por trastorno de circulación cerebral rápido; infarto cerebral lacunar en el que la principal causa es esclerosis arteriocapilar en arterias penetrantes y la alta presión sanguínea se considera un factor de riesgo.

50 En el procedimiento de la presente descripción la detección y/o predicción se pueden llevar a cabo recogiendo muestras de una o más personas sanas y un sujeto, midiendo la concentración y/o actividad del enzima de ADAMTS13 contenido en las muestras, y comparando los valores medidos. En general es preferible que las muestras recogidas de personas sanas se usen para determinar intervalos normales de la concentración y/o actividad del enzima de ADAMTS13, o valores umbrales de los mismos para valoración del avance. Cuando se determinen intervalos normales o los valores umbrales para valoración la detección y/o predicción en un sujeto se puede llevar a cabo solo analizando ADAMTS13 respecto al sujeto que se va a evaluar. Los intervalos normales o los valores umbrales para valoración se considera que dependen de varias condiciones, tales como una enfermedad subyacente, sexo, o edad. Sin embargo los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente los intervalos normales o los umbrales de evaluación seleccionado una población estadística apropiada que corresponde al sujeto(s) y procesando estadísticamente los datos obtenidos de esa población.

Por ejemplo en la población mostrada en los ejemplos descritos a continuación los valores relacionados como anormales fueron 50% o menos y 40% o menos respecto a la concentración de ADAMTS13 y a la actividad del enzima de ADAMTS13 respectivamente.

5 En el procedimiento de la presente descripción no se limita un procedimiento de análisis de la concentración o de actividad del enzima de ADAMTS13, en tanto que la concentración o actividad del enzima de ADAMTS13 puedan determinarse cuantitativa o semicuantitativamente, o se pueda valorar una presencia o ausencia de ADAMTS13 mediante el procedimiento de análisis.

10 Ejemplos del procedimiento de análisis de la concentración de ADAMTS13 incluyen un procedimiento inmunológico que usa un anticuerpo anti-ADAMTS13 o un fragmento del mismo (tal como un ensayo inmunosorbente relacionado con enzima, un inmunoensayo de aglutinamiento de látex, un inmunoensayo de quimioluminiscencia, un procedimiento de anticuerpo fluorescente, un radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, tinción inmunohistoquímica o Western blotting), un procedimiento bioquímico (tal como un procedimiento enzimológico), o un procedimiento biológico molecular para la medida de un ARNm.

15 Cuando se usa un procedimiento inmunológico para analizar ADAMTS13 se puede preparar un anticuerpo anti-ADAMTS13 o un fragmento del mismo de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como un procedimiento descrito en el documento WO 2004/029242. Cada inmunoensayo se puede llevar a cabo de acuerdo, por ejemplo, con el documento WO 2004/029242.

20 Como un procedimiento de medida de la concentración de ADAMTS13 es preferible un procedimiento inmunológico desde el punto de vista de la sensibilidad y conveniencia. El procedimiento inmunológico significa un procedimiento de análisis de ADAMTS13 mediante un procedimiento ELISA, un procedimiento de látex, inmunocromatografía que usa un anticuerpo frente a ADAMTS13. Ejemplos del procedimiento inmunológico incluyen un procedimiento de competición usando un ADAMTS13 etiquetado, un procedimiento sándwich que usa un anticuerpo etiquetado, un procedimiento de esfera de látex en el que se observa aglutinamiento de esferas recubiertas con un anticuerpo, y un procedimiento que usa un anticuerpo conjugado con una partícula coloreada tal como coloide de oro. Se incluye cualquier procedimiento que usa el anticuerpo contra ADAMTS13 en realizaciones preferidas de la presente descripción. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Se puede usar un fragmento de anticuerpo, tal como FAb, FAb', F(Ab')₂ o Fv.

30 Ejemplos del procedimiento de análisis de la actividad del enzima de ADAMTS13 incluyen un procedimiento bioquímico que usa vWF o un fragmento del mismo [por ejemplo, un procedimiento de detección de multímeros de vWF grandes, usando una combinación de una electroforesis en SDS-agarosa y autorradiografía o Western blotting (referencia no patente 3), o un procedimiento de detección de una actividad de escisión de vWF, usando un sustrato preparado introduciendo un grupo fluorescente [2-(N-metilamino)benzoílo, Nma] y un grupo desactivante (2,4-dinitrofenilo, Dnp) en un péptido sintético que corresponde a 73 residuos de ASP1596-Arg1668 localizado en el dominio A2 de vWF (referencia no patente 4), y un procedimiento inmunológico que usa vWF o un fragmento del mismo, y un anticuerpo o un fragmento del mismo específico del sitio de escisión de vWF por ADAMTS13.

35 Adicionalmente como el procedimiento de análisis de la actividad del enzima de ADAMTS13 se puede usar un procedimiento que usa un sustrato sintético o un inmunoensayo. Estos procedimientos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en la memoria descriptiva de la solicitud de patente japonesa nº 2005-148793, es decir, un procedimiento de análisis que comprende las etapas de (1) poner en contacto en un líquido una muestra que contiene posiblemente ADAMTS13 con un sustrato inmovilizado preparado mediante unión de vWF o un fragmento del mismo con un vehículo insoluble, (2) separación del líquido del vehículo insoluble y (3) análisis del vWF o el fragmento del mismo que se mantiene en el vehículo insoluble, y/o un fragmento de vWF (es decir, fragmento de sustrato) que se libera del vehículo insoluble y está contenido en el líquido. Tales procedimientos de análisis incluyen una realización en la que el vWF o el fragmento del mismo unido en el vehículo insoluble está etiquetado con una sustancia de etiquetaje, en el lateral del fragmento de sustrato liberado del vehículo insoluble mediante la escisión con ADAMTS13.

40 Además un anticuerpo o un fragmento del mismo, o aptámero, que se une específicamente a un neoantígeno recién generado por escisión de vWF con ADAMTS13 (es decir, una secuencia parcial que contiene el aminoácido localizado en la sección), puede etiquetarse con una sustancia de etiquetaje, y se usó en la etapa de análisis para analizar la actividad del enzima. Ejemplos de la sustancia de etiquetaje incluyen una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente, una sustancia que desarrolla color, y un enzima. Ejemplos del vehículo insoluble incluyen partículas de látex formadas por varios plásticos (tales como polipropileno, poliestireno, policarbonato, poliamida y politetrafluoroetileno), partículas de vidrio, partículas magnéticas y una placa de microtítulos.

55 Una muestra preferida que se va a ensayar con el procedimiento de la presente descripción es, por ejemplo, sangre tal como plasma o un suero. Ejemplos de muestras distintas de sangre incluyen diversos fluidos corporales, tales

como fluidos celulares o de tejido, linfa, un fluido tímico, un fluido de ascitos, un fluido amniótico, jugos gástricos, orina, jugos pancreáticos, fluido de la médula espinal y saliva.

[2] Kit de detección

5 El kit de detección de la presente descripción se puede usar para llevar a cabo el procedimiento de la presente descripción. De acuerdo con sujetos que se van a analizar para detectar las afecciones citadas anteriormente, el kit de detección de la presente descripción incluye un kit de detección de análisis de la concentración de ADAMTS13 (en lo sucesivo denominado como un kit de tipo concentración-análisis) y un kit de detección de análisis de la actividad del enzima de ADAMTS13 (en lo sucesivo denominado como un kit de tipo actividad-análisis).

10 El kit de tipo concentración-análisis de la presente descripción comprende al menos un anticuerpo anti-ADAMTS13 o un fragmento del mismo y preferiblemente comprende dos o más tipos diferentes de anticuerpos de anti-ADAMTS13. Los anticuerpos anti-ADAMTS13 pueden ser monoclonales o policlonales. Cuando están contenidos dos o más tipos diferentes de anticuerpos anti-ADAMTS13 en el kit, cualquiera de los anticuerpos (segundo anticuerpo) puede estar etiquetado (es decir, marcado), o se puede añadir al kit un anticuerpo etiquetado específico al segundo anticuerpo, en lugar del etiquetaje.

15 El kit de tipo actividad-análisis de la presente descripción comprende al menos vWF o un fragmento del mismo. Además, se puede etiquetar al kit vWF o un fragmento del mismo. Adicionalmente en lugar del etiquetaje se puede añadir al kit un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un neoantígeno recién generado por escisión de vWF con ADAMTS13 (es decir, una secuencia parcial que contiene el aminoácido localizado en la sección).

20 Ejemplos

La presente descripción se ilustrará ahora adicionalmente, pero sin limitarse a estos, con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: medida de actividad de ADAMTS13 por electroforesis en SDS-gel de agarosa

25 Se mezclaron un suero reunido humano normal y una dilución en serie del mismo, que contenía ADAMTS13 con un volumen igual de un tampón tris (pH 7,4; que contiene 1,5 mol/l de urea y 0,1 mol/l de cloruro de bario) y se suplementaron con clorhidrato de fluoruro de 4-[2-aminoetil]bencenosulfonilo; Pefabloc (Roche) en una concentración final de 2,4 mmol/l. Estas soluciones de muestra se mezclaron con un tampón tris (pH 7,4, 1,5 mol/l de urea) que contiene 3 µg/ml de vWF (purificado a partir de plasma humano de acuerdo con el procedimiento descrito en la referencia no patente 3) a una relación en volumen de 1:5, y se incubó a 37° C durante la noche para escindir el vWF recombinante con ADAMTS13 contenido en las soluciones de muestra. La reacción de escisión se terminó añadiendo EDTA a la misma a una concentración final de 40 mmol/l. Estas muestras tratadas se sometieron a una electroforesis en gel de SDS-agarosa (gel de agarosa al 1,4%) y se transfirieron bandas de vWF separadas a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) mediante Western blotting. Se bloqueó la membrana con un agente de bloqueo disponible comercialmente (BlockAce; Dainippon Pharmaceutical) a temperatura ambiente y se lavó con un tampón Tris (pH 7,4). Se hizo reaccionar la membrana con un anticuerpo anti-vWF etiquetado con HRP (peroxidada obtenido de cola de caballo) (DAKO){1:1000 diluido con tampón tris (pH 7,4) / BlockAce al 10%] a temperatura ambiente durante una hora, y se lavó con un tampón Tris (pH 7,4) tres veces. Se visualizaron las bandas de vWF usando un kit de desarrollo comercialmente disponible (Immunostain HRP-1000, Konica).

40 El resultado de la electroforesis se muestra en la figura 1. En la figura 1 el valor (unidad = %) mostrada en cada línea es un contenido del suero reunido humano normal contenido en el suero reunido y las series diluidas del mismo cuando el suero reunido humano normal está referido como 100%. ADAMTS13 contenía en cada muestra vWF escindido y se detectaron bandas de vWF que presentan una longitud diferente de acuerdo con su tamaño de múltiplo.

45 Se preparó una curva estándar en la que el eje X es la longitud (unidad = mm) de cada banda de vWF y el eje Y es el contenido del suero reunido y se muestra en la figura 2.

Ejemplo 2: medida de la cantidad de antígeno ADAMTS13 en casos de enfermedad cerebrovascular

Se ensayaron muestras de plasma recogidas de pacientes con infarto cerebral aterotrombótico y pacientes con infarto de cerebro lacunar para medir la cantidad de un antígeno ADAMTS13. La cantidad del antígeno ADAMTS13 se midió usando un kit comercialmente disponible (kit ELISA enzima de escisión de vWF; Mitsubishi Kagaky Iatron).

50 Los resultados relativos a los casos de infarto cerebral aterotrombótico e infarto cerebral lacunar se muestran en las figuras 3 y 4 respectivamente. En las figuras 3 y 4 el eje Y es la cantidad del antígeno ADAMTS13 (unidad = i),

cuando la cantidad del antígeno ADAMTS13 contenido en el suero reunido humano normal es del 100%. “P < 0,05” mostrado en la figura 3 significa que hay una diferencia significativa: el nivel de significancia es menor del 5%. “P < 0,01” mostrado en la figura 4 significa que hay una diferencia significativa: nivel de significancia menor que 1%.

5 En los casos de infarto cerebral aterotrombótico (figura 3) la cantidad de antígeno ADAMTS13 se compara en presencia y ausencia de complicación de eventos vasculares [por ejemplo, infarto de miocardio anterior (OMI) y/o arteriosclerosis obliterans (ASO)] en otras regiones (es decir, regiones distintas al cerebro). La cantidad del antígeno ADAMTS13 en el grupo con la complicación de eventos vasculares en otras regiones era significativamente menor en comparación con la del grupo sin complicación.

10 En los casos de infarto cerebro lacunar (figura 4) los pacientes se clasificaron en un grupo de infarto simple y un grupo multi-infarto de acuerdo con un análisis MRI, y la cantidad del antígeno ADAMTS13 se compara entre los grupos. La cantidad del antígeno ADAMTS13 en el grupo multi-infarto se redujo de forma significativa en comparación con la del grupo de infarto simple.

15 Los resultados mostrados en las figuras 3 y 4 sugieren que cuando la concentración en sangre de ADAMTS13 es baja en un paciente con enfermedad cerebrovascular, la enfermedad arteriosclerótica vascular va en progreso, y esto indica que la ADAMTS13 es útil como un marcador que refleja la extensión de la enfermedad cerebrovascular. Por ejemplo, el infarto cerebral aterotrombótico es provocado por estenosis u oclusión arterial debida a la formación de ateroma en la parte cervical de la arteria carótida interna o la parte horizontal de la arteria cerebral media. Adicionalmente, el infarto de miocardio previo y arteriosclerosis obliterans se considera como enfermedad vascular arteriosclerótica. Adicionalmente el infarto cerebral lacunar es provocado principalmente por esclerosis arteriocapilar en arterias penetrantes. En un paciente con infarto lacunar múltiple la arteriosclerosis se observa frecuentemente en arterias distintas de las arterias cerebrales, y se considera que la enfermedad vascular arteriosclerótica va en progreso en comparación con el infarto simple.

Ejemplo 3: observaciones clínicas y valores de ADAMTS13 en pacientes que avanzaron hacia una afección acompañada por el comienzo de alteración de la consciencia y/o fallo multiorgánico

25 En 133 casos de enfermedad cerebrovascular de la fase subaguda a la fase crónica, incluyendo 50 casos de infarto cerebral aterotrombótico, 22 casos de infarto cerebral cardioembólico, 34 casos de infarto cerebral lacunar, 19 casos de hemorragia cerebral y 8 casos de hemorragia subaracnoidea, la actividad del enzima de ADAMTS13 se midió mediante electroforesis en gel de SDS-agarosa descrita en el ejemplo 1 y se midió la cantidad del antígeno de ADAMTS13 con el kit comercialmente disponible (kit ELISA de enzima de escisión de vWF; Mitsubishi Kagaku Iatron) descrito en el ejemplo 2. En 6 de estos casos la actividad de ADAMTS13 era inferior al 30%. Todos los 6 casos eran de infarto cerebral [3 casos de infarto cerebral cardioembólico (CEBI) y 3 casos de infarto cerebral lacunar (LBI)] e iban acompañados de hepatopatía grave (1 caso de colangiocarcinoma, 1 caso de hepatitis alcohólica y 4 casos de hepatitis C crónica) y alteración de la consciencia. Las observaciones clínicas y valores de ADAMTS en los 6 casos se muestran en la tabla 1.

35 Tabla 1

Casos			Tipo	ADAMTS13 en admisión		Complicaciones en la admisión	ADAMTS13 en descarga
Nº	Edad	Sexo		Antígeno (%)	Actividad (%)		Actividad (%)
1	81	Hembra	CEBI	30,6	14,7	Colangiocarcinoma Hepatoma metastásica Colangitis	0,0
2	61	Macho	CEBI	31,1	13,9	Hepatitis alcohólica	0,0
3	69	Macho	CEBI	33,2	14,2	Cirrosis Neumonía	0
4	76	Macho	LBI	39,2	20,8	Hepatitis C 0. Cirrosis	3,4

5	84	Macho	LBI	37,8	18,8	Hepatitis C pulmonar	0
						Carcinoma cirrosis	
						Pneumonía	
6	70	Macho	LBI	38,4	21,2	Hepatitis C	39,4
						Colecistitis	

5 En 5 casos (casos números 1 a 5) de los 6 casos anteriores, como se muestra en la tabla 1, los pacientes mostraron una reducción adicional de actividad de ADAMTS13 en hospital, avance de síndrome de disfunción multi-orgánica (MODS) y posterior fallecimiento. Por el contrario el paciente del caso nº 6 no avanzó hasta MODS, evitando un pobre pronóstico, y aún vive.

10 El progreso clínico en el caso nº 1 se muestra en la figura 5. En la figura 5 las abreviaturas “Ag” y “ACT” significan la cantidad de antígeno ADAMTS13 y la actividad del enzima de ADAMTS13 respectivamente. El paciente del caso nº 1 fue admitido en hospital (comienzo de colangiocarcinoma, metástasis de hígado múltiple, y colangitis recurrente como enfermedades subyacentes en la admisión) el 22 de Junio de 2004, aparecieron alteración de la consciencia y síndrome de disfunción multi-orgánica (MODS) el 10 de Septiembre e 2004, llegando a ser las afecciones gradualmente peores, y falleció el 28 de septiembre de 2004.

15 Se deduce a partir de los resultados anteriores que un nivel de ADAMTS13 reducido de forma notable en un paciente con hepatopatía grave promueve la alteración de la consciencia y MODS. Es decir, se considera que la “reducción notable en ADAMTS13” por si mismo juega un importante papel para el progreso hacia una afección acompañada por el comienzo de alteración de consciencia y/o disfunción multi-orgánica. Además en el caso nº 6 entre los anteriores 6 casos [es decir, el caso donde la actividad de ADAMTS13 era baja (21%), pero se mantuvo la actividad y no se reducía de nivel], el paciente no avanzaba hacia MODS, y se evitaba un pobre pronóstico. Este resultado no solo sugiere una posibilidad de que la “reducción notable en ADAMTS13” es una causa del progreso de afecciones graves, sino también indica una efectividad nueva en una terapia de sustitución de ADAMTS13 que no se ha usado en el pasado. El progreso hacia MODS se puede predecir prematuramente y se puede determinar un tratamiento en una fase temprana, controlando la cantidad del antígeno ADAMTS13 y la actividad del enzima del mismo y detectando la extensión de la reducción, y se concluye que llegará a ser un diagnóstico que puede salvar las vidas de pacientes.

Aplicabilidad industrial

25 La presente descripción se puede aplicar a un uso para la detección de afecciones en pacientes con alteración de la consciencia.

Si bien la presente descripción se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, son posibles varios cambios y modificaciones obvios para los especialistas en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento in vitro para la detección o predicción de la gravedad de una enfermedad cardiovascular en un paciente con alteración de la consciencia, en el que se analiza la cantidad y/o actividad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand y en el que dicha enfermedad cerebrovascular se selecciona del grupo que consiste en infarto cerebral aterotrombótico, infarto de cerebro cardioembólico e infarto cerebral lacunar.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand se analiza con un procedimiento inmunológico usando un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteasa de escisión del factor de von Willebrand.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand se analiza usando un factor de von Willebrand o un fragmento del mismo.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha alteración de la consciencia es estupor o coma.

Figura 1

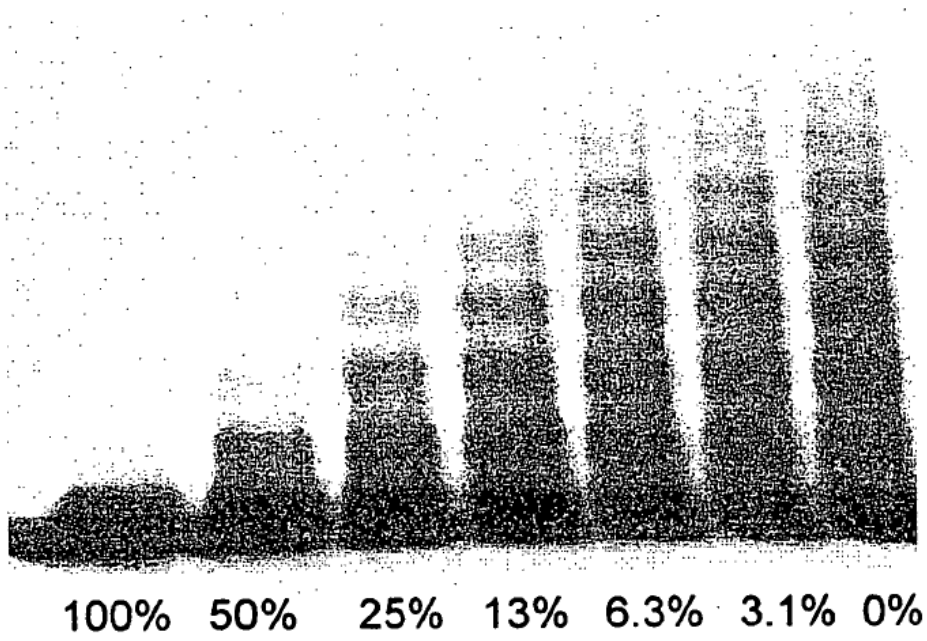


Figura 2

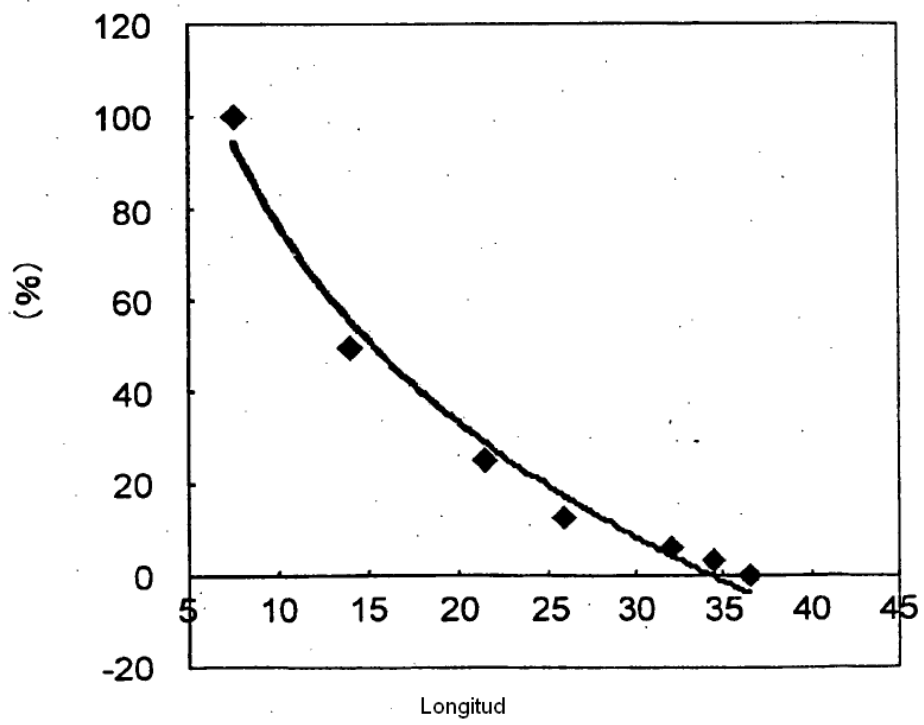


Figura 3

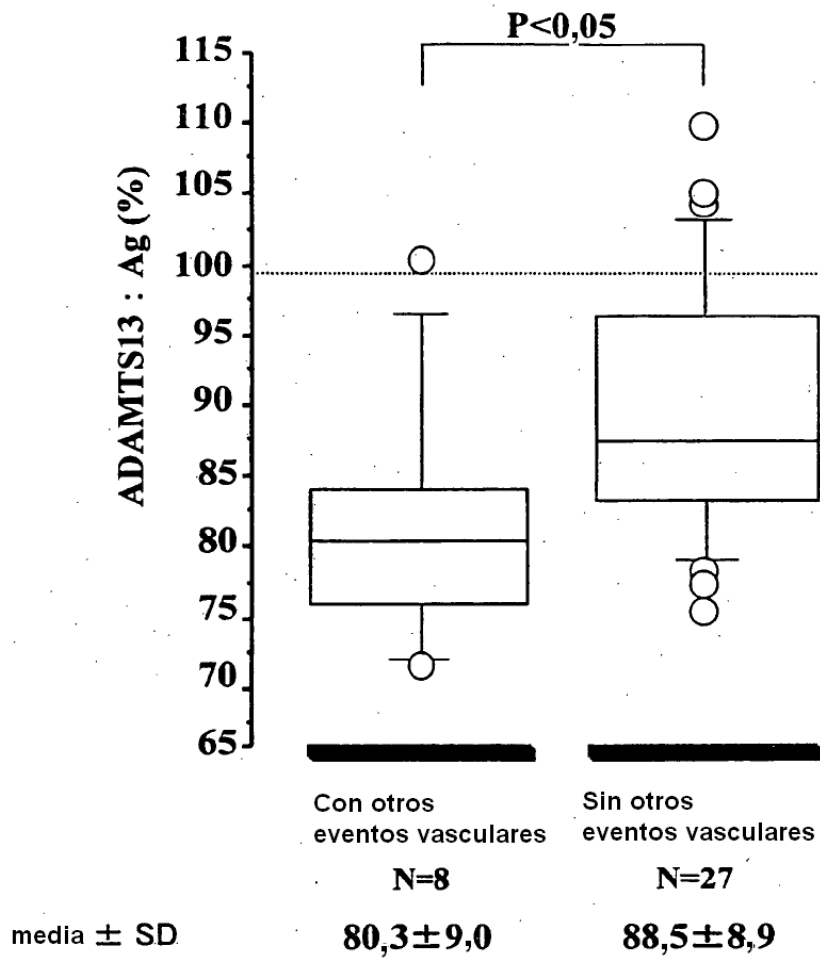


Figura 4

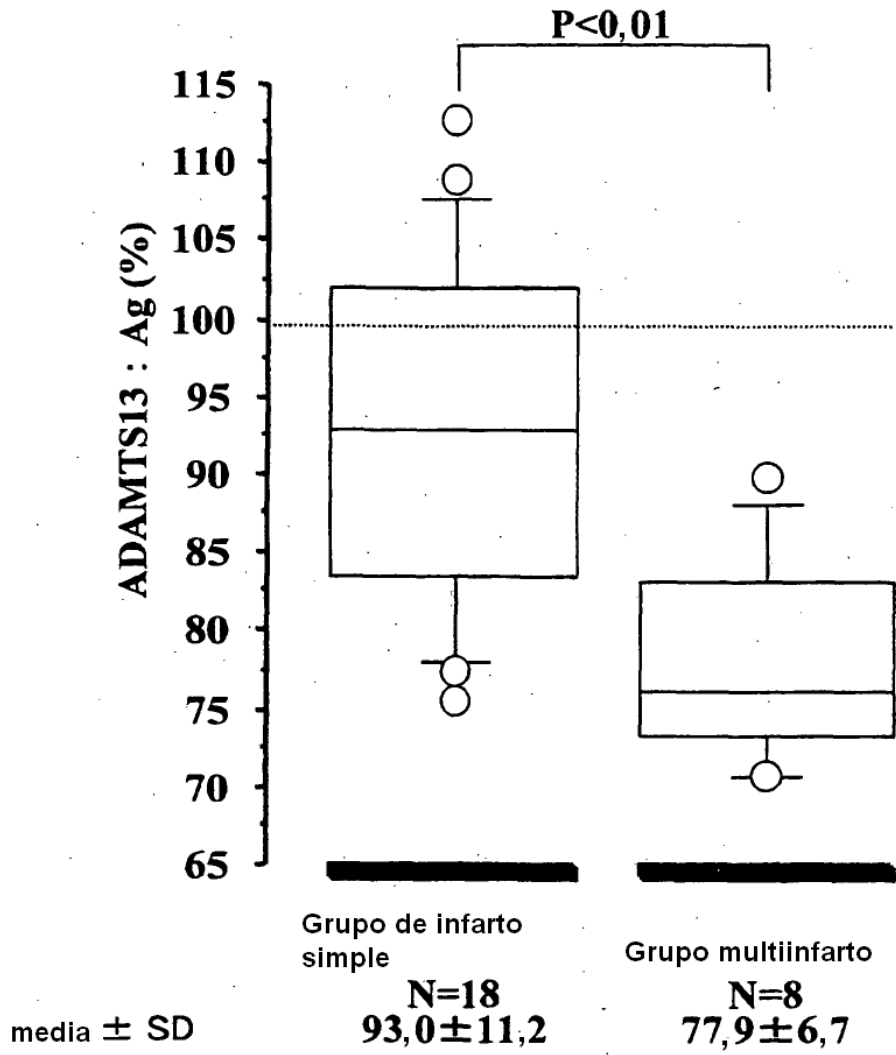


Figura 5

