

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 880**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04807583 .2**
96 Fecha de presentación: **22.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1712918**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Procedimiento de detección de trombosis mediante la medición de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand**

30 Prioridad:
22.12.2003 JP 2003425706

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.10.2012

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;
SOEJIMA, Kenji;
HIRASHIMA, Masaki;
MORIKAWA, Wataru y
SAKATA, Yoichi**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 387 880 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de trombosis mediante la medición de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar trombosis o el grado de gravedad de trombofilia en base a la medición de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand como se caracteriza por las reivindicaciones anexas. La presente invención se puede llevar a cabo mediante el uso de un procedimiento inmunológico con un anticuerpo monoclonal y / o un anticuerpo policlonal contra la proteasa de escisión del factor de von Willebrand.

Técnica anterior

- 10 Cuando una pared de un vaso sanguíneo está dañada y el tejido subendotelial es expone al flujo sanguíneo, las plaquetas en el flujo sanguíneo rápidamente se adhieren al tejido subendotelial. La adhesión requiere un factor de von Willebrand (de aquí en adelante llamado simplemente "vWF") en plasma. El vWF desencadena una serie de etapas de activación, tal como agregación de plaquetas y una liberación de gránulos intracelulares, y después, se forma trombos que conducen a hemostasis. En general, el vWF se secreta a partir de un endotelio vascular a la sangre en forma de una macromolécula que tiene un peso molecular de más de 20.000 kDa, y se escinde por una metaloproteasa, la proteasa de escisión de vWF, en multímeros que tienen pesos moleculares de 500 a 20.000 kDa, que circulan a través de la sangre. Cuando se produce una enfermedad (es decir, cuando se provoca un alto esfuerzo de cizalla por oclusión o similares), la conformación de vWF cambia a una estructura expandida. Se sabe que el vWF expandido tiene alta actividad de agregación de plaquetas, y el vWF expandido es propenso a que se degrade por la proteasa de escisión de vWF. Se considera que cuando la actividad de la enzima se reduce por alguna razón, las moléculas de vWF "inusualmente grandes" se sobreproducen en la sangre y se unen de manera eficaz a plaquetas y, como resultado, se promueve la agregación de plaquetas en los vasos sanguíneos para formar trombos en microcirculación. Tal formación de trombos implicada en las plaquetas es esencial para los mecanismos hemostáticos fisiológicos. Sin embargo, los trombos provocan enfermedades trombóticas (tal como infarto de miocardio, infarto cerebral, o trombosis cerebral), que son una causa principal de muerte y un serio problema en la sociedad anciana.

- Se ha clarificado que la proteasa de escisión de vWF está implicada en la púrpura trombótica trombocitopénica (de aquí en adelante llamada simplemente "PTT") que es extremadamente grave y tiene un alto grado de fatalidad, que un autoanticuerpos, que inhibe la actividad de la proteasa de escisión de vWF se produce en PTT aguda y esporádica, y que la actividad de la proteasa de escisión de vWF es inactiva en PTT familiar. Aunque una parte de de la proteasa de escisión de vWF se purificó en 1996 (referencia de no patente 1), el total de la misma no estuvo identificado hasta 2001. Debido a que la proteasa de escisión de vWF muestra su actividad enzimática solamente en la presencia de 1,5 mol/l de urea/5 mmol/l de tampón Tris (pH 8,0) in vitro, era difícil identificar la proteasa de escisión de vWF como una sustancia. Recientemente, se purificó la proteasa de escisión de vWF en plasma (referencias de no patentes 2 y 3). Además, se clonó su ADNc, y el gen, que pertenece a una familia de ADAMTS (un tipo de desintegrina y metaloproteasa con el motivo de tipo 1 de trombospondina), se denominó ADAMTS13 (referencias de no patentes 4 y 5). En el mismo período de tiempo, se clarificó que la actividad de la proteasa de escisión de vWF se reducía de manera significativamente en PTT familiar, debido a una mutación del gen de la proteasa de escisión de vWF ADAMTS13 (referencia de no patente 6).

- La actividad de la proteasa de escisión de vWF se midió detectando los multímeros grandes de vWF, usando una combinación de una electroforesis de SDS-agarosa y autorradiografía o transferencia de Western (referencia de no patente 1). Sin embargo, este procedimiento de medición contiene etapas complicadas, y de este modo, comúnmente no es un ensayo de laboratorio clínico. Por ejemplo, en este procedimiento de medición, se requiere un vWF sin proteasa, el procedimiento dura 3 días, y los valores medidos a menudo varían según los laboratorios. Recientemente, se desarrolló un procedimiento de medición de la actividad de la proteasa de escisión de vWF, que comprende las etapas de expresión de una región parcial de de un dominio A2 (un sitio a ser escindido por la proteasa de escisión de vWF) del vWF en Escherichia coli usando técnicas de recombinación genética, mezclando la proteína recombinante con una muestra derivada de un paciente durante un período predeterminado, para escindir el dominio A2 por la proteasa de escisión de vWF contenida en la muestra, y detectar los productos escindidos por una combinación de electroforesis de SDS y transferencia de Western, (referencia de no patente 7). Sin embargo, este procedimiento también contiene etapas complicadas, tal como la preparación de la proteína recombinante o electroforesis, y de este modo, es difícil de usar este procedimiento en la mayoría de los laboratorios.

- La púrpura idiopática trombocitopénica (PTI) es una enfermedad en la que no se conocen los síntomas característicos y causas claras de la enfermedad, y se produce trombocitopenia por la destrucción de plaquetas promovida por mecanismos inmunológicos. En la mayoría de los casos, PTI se considera una enfermedad autoinmune provocada por un autoanticuerpo contra una plaqueta. Como un antígeno reconocido por un anticuerpo anti-plaqueta derivado de un paciente que sufre PTI, se identificó una proteína de membrana de plaqueta GPIIb-IIIa, y se desarrollaron muchos procedimientos para detectar un anticuerpo específico para esta proteína. Entre estos

procedimientos, se usa de manera amplia un ensayo de captura de antígeno que usa un anticuerpo monoclonal contra GPIIb-IIIa. Se sabe que este procedimiento muestra una alta especificidad con una pequeña cantidad de falsos positivos. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos monoclonales que se pueden usar en este procedimiento no están comercialmente disponibles, y se requieren etapas complicadas, tal como una recogida de plaquetas o una disolución de plaquetas, y de este modo, se requieren el desarrollo y estandarización de un kit conveniente. El documento WO 02/42441 describe un polipéptido de la proteasa de escisión de vWF, una molécula de ácido nucleico que codifica su secuencia de aminoácidos amino y una composición que comprende el polipéptido. También el documento WO 03/016492 describe tal proteasa y ácidos nucleicos que codifican lo mismo, así como un mutante y sus formas variantes. Konetschny et al. 2003 describe un Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de la proteasa de escisión de vWF en plasma humano.

[referencia de no patente 1] M.Furlan et al., Blood, U.S.A., 1996, vol.87, p.4223 - 4234

[referencia de no patente 2] H. Gerritsen et al., Blood, U.S.A., 2001, vol.98, p.1654 - 61

[referencia de no patente 3] K. Fujikawa et al., Blood, U.S.A., 2001, vol.98, p.1662 - 6

[referencia de no patente 4] X. Zheng et al., The Journal of Biological Chemistry, U.S.A., 2001, vol.276, p. 41059 - 63

[referencia de no patente 5] K. Soejima et al., The Journal of Biochemistry, 2001, vol.130, p.475 - 80

[referencia de no patente 6] G. G. Levy et al., Nature, United Kingdom, 2001, vol. 413, p.488 - 494

[referencia de no patente 7] K.Kokame et al., Blood, U.S.A., 2003, 08, 2861 (en prensa)

Divulgación de la invención

PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION

Como se ha descrito anteriormente, no estaba establecido un procedimiento para detectar de manera conveniente y precisa las causas de la trombosis implicadas en la agregación de plaquetas y / o trombosis, y se ha deseado tal procedimiento. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es establecer tal procedimiento deseado para detectar el grado de trombofilia en trombosis implicada en la agregación de plaquetas. El procedimiento de detección se puede usar como un procedimiento de diagnóstico que dirige un tratamiento novedoso de trombosis, tal como un aumento de velocidad de supervivencia o una determinación de tratamiento en base a los síntomas. Los presentes inventores llevaron a cabo estudios intensivos y, como resultado, encontraron que la concentración de la proteasa de escisión de vWF en plasma derivada de pacientes que padecen de trombosis se redujo de manera significativa, en comparación con las personas sanas, en base a los resultados obtenidos por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que usa anticuerpos monoclonales o policlonales contra la proteasa de escisión de vWF, y se completó la presente invención.

MEDIOS PARA SOLUCIONAR LOS PROBLEMAS

El problema puede ser solucionado por presente invención, es decir, un procedimiento de detección de trombosis o el grado de trombofilia, caracterizado por la medición de una proteasa de escisión del factor von Willebrand, en el que la trombosis se selecciona entre el grupo que consta de leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia promielocítica aguda y, de acuerdo con otra realización preferida del procedimiento de detección de la presente invención, el grado de trombofilia se detecta en un paciente con tratamiento a largo plazo con diálisis acompañado de derivación repetida.

De acuerdo con incluso otra realización del procedimiento de detección de la presente invención, una disminución en la concentración de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand para un paciente con tal enfermedad se usa como un índice, en comparación con la concentración del de las personas sanas. De acuerdo con incluso otra realización preferida del procedimiento de detección de la presente invención, la proteasa de escisión del factor de von Willebrand se mide inmunológicamente usando al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteasa de escisión del factor de von Willebrand, o un fragmento del anticuerpo.

También se describe en el presente documento un kit para detectar trombosis o el grado de trombofilia, caracterizado porque comprende un anticuerpo que específicamente se une a una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, o un fragmento del anticuerpo. El término "análisis" (por ejemplo, un análisis de un autoanticuerpo) como se usa en el presente documento incluye una detección para juzgar una presencia o ausencia de una sustancia (por ejemplo, un autoanticuerpo) a analizar, y una medición para determinar de manera cuantitativa o semicuantitativa una cantidad de una sustancia a analizar.

EFFECTOS DE LA INVENCION

La presente invención permite una detección del grado de una trombofilia en un paciente que padece una enfermedad que conduce a trombosis, tal como leucemia, y es valioso clínicamente. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, trombosis o el grado de trombofilia se puede diagnosticar de manera

conveniente, rápidamente, y específicamente. En particular, cuando la proteasa de escisión de vWF se mide de manera inmunológica, la medición se lleva a cabo en 3 a 4 horas con buena reproducibilidad, mientras que un procedimiento convencional que mide la actividad de la proteasa que usa electroforesis tarda 3 días, y los valores medidos a menudo varían de acuerdo con, por ejemplo, el analista o reactivos.

5 MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

[1] Procedimiento de detección de presente invención

En el procedimiento de detección de la presente invención, se puede evaluar el grado de trombofilia, y se puede juzgar una presencia o ausencia de trombosis, mediante la medición de una concentración de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand (proteasa de escisión de vWF) y comparar la concentración medida con la de las personas sanas. El término "proteasa de escisión del factor de von Willebrand" como se usa en el presente documento significa una metaloproteasa, denominada algunas veces ADAMTS13, que escinde específicamente el factor de von Willebrand (vWF) en el enlace entre tirosina (842) y metionina (843) contenida en un dominio de A2 del mismo.

Como se muestra en el Ejemplo 2 abajo, una concentración de la proteasa de escisión de vWF contenida en cada muestra de fluido corporal recogida de los pacientes que padecen trombosis implicada en la agregación de plaquetas disminuye de manera significativa, en comparación con personas sanas. Por lo tanto, en el procedimiento de detección de la presente invención, cuando una concentración medida de la proteasa de escisión de vWF en un sujeto a juzgar es menor que en las personas sanas, el sujeto se puede diagnosticar que tiene trombosis.

El término "trombosis" como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia promielocítica aguda (LPA) y leucemia linfocítica aguda (LLA). También se describen en el presente documento lupus sistémico eritematoso (LSE), embolia pulmonar, infarto cerebral, enfermedad venosa oclusiva (EVO), microangiopatía trombótica (MAT), y trombosis venosa profunda (TVP). Las enfermedades típicas de microangiopatía trombótica (MAT) incluyen, por ejemplo, púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) y síndrome urémico hemolítico (SUH).

PTT es una enfermedad grave caracterizada por púrpura, esto es, (1) trombocitopenia, (2) anemia microangiopática hemolítica, (3) insuficiencias renales, (4) fiebre, y (5) alteraciones neurológicas. SUH es una enfermedad grave caracterizada por triada, esto es, (1) trombocitopenia, (2) anemia microangiopática hemolítica, y (3) insuficiencias renales. PTT y SUH se consideran como una patosis común, MAT, en vista de las similitudes de en los cuadros clínicos, y se distingue clínicamente en base a la presencia o ausencia de (5) alteraciones neurológicas y la presencia o ausencia de insuficiencias renales graves. Recientemente, se ha establecido un procedimiento de medición de la actividad de la proteasa de escisión de vWF y su título de inhibidor titer, y se puede usar para distinguir PTT de SUH.

Además, como se muestra en Ejemplo 3 descrito abajo, en comparación con un grupo de pacientes sin derivación de operación, la cantidad de proteasa de escisión de vWF en un grupo de pacientes que tienen derivación repetida de operación se redujo de manera significativa, y el resultado se correlaciona con el hecho de los pacientes que tienen derivación repetida de operación mostraron una trombofilia notable. Además, después de 2 horas del comienzo de la diálisis, la cantidad de proteasa de escisión de vWF se redujo de manera significativa, en comparación con la de después de finalización de la diálisis, y el resultado de acuerdo con las observaciones clínicas de trombofilia y una tendencia al atasco de derivación durante la diálisis. Estos resultados indican que una disminución de la cantidad de la proteasa de escisión de vWF se correlaciona con un incremento en la gravedad de trombofilia. Por lo tanto, en el procedimiento de detección de la presente invención, cuando una concentración medida de la proteasa de escisión de vWF en un sujeto a juzgar es menor que en las personas sanas, se puede juzgar que el sujeto muestra trombofilia notable.

"Estado en el que la concentración de la proteasa de escisión de vWF es baja" como se usa en el presente documento incluye no solamente un estado en el que la cantidad absoluta de la proteasa de escisión de vWF es baja, sino también un estado en el que la cantidad aparente de la proteasa de escisión de vWF es baja. Por ejemplo, cuando un autoanticuerpo contra la proteasa de escisión de vWF existe, se forma un complejo de la proteasa de escisión de vWF y el autoanticuerpo, y de este modo, la cantidad aparente de la proteasa de escisión de vWF llega a ser baja.

En el procedimiento de la presente invención, se puede llevar a cabo una determinación cuantitativa de la proteasa de escisión de vWF, por ejemplo, mediante un procedimiento inmunológico o mediante un procedimiento bioquímico (tal como un procedimiento enzimológico), preferiblemente por un inmunoensayo usando un anticuerpo monoclonal y / o policlonal que específicamente se une a la proteasa de escisión de vWF (de aquí en adelante denominado "anticuerpo anti-vWF-CP"), o un fragmento del anticuerpo. Como el fragmento de anticuerpo, se puede usar por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv. De aquí en adelante, el procedimiento de la presente invención se ilustrará además mediante realizaciones usando un anticuerpo (es decir, una molécula de inmunoglobulina per se), pero es fácil para los expertos en la técnica reemplazar el anticuerpo con un fragmento de anticuerpo, si se desea.

En el procedimiento de la presente invención, es preferible usar dos o más anticuerpos anti-vWF-CP que tengan especificidades diferentes, más preferiblemente una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP (es decir, el primer anticuerpo monoclonal), y otro anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP que se une a la proteasa de escisión de vWF en una región diferente de la reconocida por el primer anticuerpo monoclonal (es decir, el segundo anticuerpo monoclonal) o un anticuerpo policlonal anti-vWF-CP. Como el anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP, se pueden mencionar, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón WH10 (IgG1), WH2-22-1A (IgG1), WH63.1 (IgG1), WH7-2B (IgG1), WH14-3 (IgG1), o WH50-3 (IgG1). Es preferible que al menos uno de los anticuerpos monoclonales anti-vWF-CP sea de los anticuerpos monoclonales de ratón WH10 (IgG1), WH2-22-1A (IgG1), y WH63.1 (IgG1). El primer anticuerpo monoclonal preferible es el anticuerpo WH10, y el segundo anticuerpo monoclonal preferible es anticuerpo WH2-22-1A o WH63.1.

Los anticuerpos monoclonales de ratón WH10, WH2-22-1A, y WH63.1 se producen por hibridomas WH10, WH2-22-1A, y WH63.1, respectivamente. Los hibridomas WH10 y WH63.1 se depositan internacionalmente en el Instituto Nacional Depositario del Organismo de Patentes de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305 - 8566 Japón) el 4 de septiembre de 2002, y los números de depósito internacionales son FERM BP-8174 y FERM BP-8175, respectivamente. El hibridoma WH2-22-1A se depositó domésticamente en Instituto Nacional Depositario del Organismo de Patentes de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada el 22 de abril de 2003, y se transfirió a un depósito internacional el 12 de septiembre de 2003. El número de depósito internacional (el número en paréntesis [] seguido del número de depósito internacional es el número de depósito doméstico) es FERM BP-08483 [FERM P-19324]. Los anticuerpos monoclonales o policlonales usados en la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos convencionales, excepto que la proteasa de escisión de vWF se usa como un inmunógeno. Los anticuerpos monoclonales anteriores WH7-2B, WH14-3, y WH50-3, que no se han depositado pero que se pueden usar en la presente invención, se prepararon de una forma similar.

Cuando se usa un inmunoensayo en el procedimiento de la presente invención, el ensayo se puede llevar a cabo de acuerdo con, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) comúnmente usado usando un procedimiento de sándwich, o un procedimiento de aglutinación comúnmente usado o un procedimiento de RIA usando un procedimiento de sándwich o un procedimiento de competición. Cada procedimiento se puede llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento convencional. Es preferible que el procedimiento de la presente invención se lleve a cabo mediante un procedimiento de tipo sándwich de dos etapas usando anticuerpos monoclonales anti-vWF-CP. El procedimiento de tipo sándwich de dos etapas se puede llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con los siguientes procedimientos.

En una realización preferida, un anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP inmovilizado sobre un vehículo apropiado (tal como una placa de 96 pocillos) se usa como el primer anticuerpo. El primer anticuerpo monoclonal inmovilizado se hace reaccionar con una muestra a ensayar (tal como una muestra experimental) que contiene una sustancia a medir (es decir, la proteasa de escisión de vWF), o una solución estándar que contiene la proteasa de escisión de vWF, a temperatura ambiente durante 2 horas [la primera etapa]. El segundo anticuerpo anti-vWF-CP (tal como un anticuerpo monoclonal de ratón anti-vWF-CP) marcado con una enzima se añade a la placa, y se deja en reposo a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, para que reaccione el segundo anticuerpo con un producto de (es decir, un complejo para el primer anticuerpo monoclonal y la sustancia a medir) obtenido en la primera etapa [la segunda etapa]. Se añaden reactivos de coloración para comenzar la reacción de coloración, y se añade ácido sulfúrico 0,5 N para parar la reacción. Y después, se mide una absorbancia a 450 nm.

En otra realización preferida, después de la primera etapa, se añade un suero de conejo anti-vWF-CP (es decir, anticuerpo policlonal de conejo anti-vWF-CP) como el segundo anticuerpo se añade a la placa, y se deja en reposo a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, para que reaccione el segundo anticuerpo con un producto de reacción (es decir, un complejo del anticuerpo monoclonal y la sustancia a medir) obtenido en la primera etapa. Si se desea, se puede añadir a la placa una cierta cantidad de un anticuerpo marcado (tal como un anticuerpo anti-conejo-IgG marcado), y se deja en reposo a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Como se ha descrito anteriormente, se puede medir la proteasa de escisión de vWF contenida en una muestra a ensayar.

En el procedimiento de la presente invención, cada anticuerpo se puede inmovilizar (es decir, insolubilizar) mediante unión física o química a un vehículo insoluble, de acuerdo con procedimientos convencionales. Como el vehículo para la insolubilización se puede usar, por ejemplo, poliestireno, Sephadex, resinas de intercambio iónico, un tubo de plástico, o copolímeros amino. La solubilización se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un procedimiento de unión covalente (tal como un procedimiento diazo, un procedimiento de péptido, o un procedimiento de alquilación), un procedimiento de unión a vehículo usando un reactivo de reticulación, un procedimiento de unión iónica que usando un vehículo tal como resinas de intercambio iónico o un procedimiento de absorción física usando vidrios porosos tales como perlas de vidrio como vehículo.

El anticuerpo policlonal usado en la presente invención no está particularmente limitado, mientras que se reconoce la proteasa de escisión de vWF. Como el anticuerpo policlonal, se puede usar un antisuero producido en un cuerpo vivo mediante administración, a un mamífero, del mismo antígeno que se usa en la preparación del anticuerpo monoclonal anteriormente mencionado. El antisuero se puede recoger de un mamífero de acuerdo con un procedimiento convencional.

Como el anticuerpo marcado usado marcar, se pueden usar diversos anticuerpos marcados conocidos. Tal anticuerpo marcado se puede preparar, por ejemplo, mediante el marcado de un antisuero comercialmente disponible (es decir, anticuerpo anti-inmunoglobulina), que se obtiene de un animal inmunizado (por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, un conejo, una oveja, una cabra, un caballo o ganado), con una enzima apropiada [por ejemplo, una peroxidasa (POD), una fosfatasa alcalina, una β -D-galactosidasa, o una fosfatasa ácida] de acuerdo con un procedimiento convencional. Como el anticuerpo marcado se pueden usar, por ejemplo, un anticuerpo anti-conejo-IgG marcado con POD o un anticuerpo anti-ratón-IgG marcado con POD.

Una muestra preferida a ensayar por procedimiento de la presente invención es, por ejemplo, plasma sanguíneo. Como muestras diferentes del plasma, se pueden mencionar, por ejemplo, diversos fluidos corporales, tales como fluidos celulares o tisulares, linfa, un fluido de timo, un fluido de ascitos, un fluido amniótico, jugos gástricos, orina, jugos pancreáticos, fluido espinal, o saliva. El plasma es preferiblemente plasma citrado.

Como una solución usada en el sistema de medición, se pueden usar diversas soluciones que no producen una mala influencia en la reacción. Como la solución, es preferible un tampón que tenga un pH de aproximadamente 5,0 a 9,0, tal como un tampón citrato, un tampón fosfato, un tampón Tris-HCl, o un tampón carbonato. Es preferible que el disolvente contenga aproximadamente 0,1 a 10 % de p/v% de suero y / o aproximadamente NaCl 0,1 a 1 M, en vista del (de los) objeto (s) en el procedimiento de la presente invención.

En el procedimiento de la presente invención, después de la inmunoreacción, se puede llevar a cabo una separación de fase sólida - fase líquida (es decir, el complejo del producto de reacción y el anticuerpo marcado-el anticuerpo marcado sin reaccionar en el procedimiento de sándwich de dos etapas) mediante un procedimiento convencional, tal como centrifugación, filtración, decantación, o lavado.

Una actividad enzimática de la sustancia marcada separada como antes se puede medir mediante un procedimiento conocido de acuerdo con el tipo de enzima para marcar. Como la solución colorante usada en la medición, se puede usar una sustancia utilizada comúnmente. Por ejemplo, cuando se usa una peroxidasa como la enzima para marcar, tetrametil benzidina (TMB), o-fenilendiamina (OFD), o similares. La reacción de coloración se puede detener de acuerdo con un procedimiento convencional, por ejemplo, mediante la adición de un inhibidor apropiado para la enzima, tal como ácido sulfúrico 0,5 a 4 N, a la solución de reacción.

[2] Kit de detección

El kit de detección también descrito en el presente documento contiene al menos un anticuerpo anti-vWF-CP o un fragmento del mismo, y preferiblemente contiene dos o más anticuerpos anti-vWF-CP que tiene diferentes especificidades. El kit de detección se puede usar para el procedimiento de detección de la presente invención.

En el kit de detección descrito en el presente documento, es más preferible usar una combinación del primer anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP, y otro anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP que se une a la proteasa de escisión de vWF en una región diferente de la reconocida por el primer anticuerpo monoclonal (es decir, el segundo anticuerpo monoclonal) o el anticuerpo policlonal anti-vWF-CP. El primer anticuerpo preferiblemente se puede inmovilizar sobre un vehículo apropiado (es decir, un vehículo para inmovilización). El segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo marcado. Como alternativa, el kit puede contener un anticuerpo marcado contra el segundo anticuerpo, cuando el segundo anticuerpo no está marcado.

Un reactivo que contiene el anticuerpo monoclonal puede contener un agente de estabilización, tal como glicerol o proteínas séricas bovinas. El reactivo del anticuerpo puede estar en forma líquida o una forma liofilizada. Cuando el kit contiene el reactivo de anticuerpo en una forma liofilizada, el kit puede contener un disolvente acuoso o un disolvente miscible con agua. Además, el reactivo de anticuerpo puede contener un tampón capaz de mantener un pH constante en un sistema de reactivo reconstituido, o un conservante para evitar el deterioro. Como el tampón, es preferible un tampón capaz de mantener un pH de aproximadamente 5,0 a 9,0, cuando el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo. Un agente de reconstitución preferiblemente contiene agua. En el agente de reconstitución, una parte de agua o el total de la misma se pueden reemplazar con un reactivo miscible con agua. Como el reactivo miscible con agua, se pueden usar reactivos conocidos, tales como glicerol, alcoholes, o éteres de glicol.

Ejemplos

La presente invención ahora se ilustrará, pero no significa que se limite, por los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Medición de la proteasa de escisión de vWF

(a) Combinaciones de anticuerpos monoclonales: Inmunoensayo de enzima de sándwich para proteasa de escisión de vWF

Entre 6 clones de anticuerpos monoclonales anti-vWF-CP (WH10, WH2-22-1A, WH63.1, WH7-2B, WH14-3, y WH50-3) obtenidos mediante el uso de la proteasa de escisión de vWF como inmunógeno, se determinó su combinación más apropiada de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Cada anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP se diluyó hasta 2 µg/ml con una solución salina tamponada con fosfato (SSTF), y se añadió a cada pocillo (100 µl por pocillo) de una placa de 96 pocillos EIA (Nunc). La placa se dejó en reposo a 4°C durante toda una noche para revestimiento. Se retiraron los anticuerpos no unidos mediante lavado con SSTF, y se añadieron a cada pocillo 250 µl de SSTF suplementada con 2% de albúmina sérica bovina (ASB). La placa se dejó en reposo a 4°C durante toda una noche para bloquear. Se retiró la solución de bloqueo mediante lavado con SSTF que contenía 0,1% de Tween20 (SSTFT), y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una muestra (plasma combinado humano normal) o un estándar (preparado a partir de un antígeno de proteasa de escisión de vWF purificado). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se retiró mediante lavado con SSTFT, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de 1 µg/ml anticuerpo anti-vWF-CP marcado con biotina. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. El tampón de reacción se retiró mediante lavado con SSTFT, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una 0,1 µg/ml de estreptavidina marcada con peroxidasa (BioRad). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar, se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de tetrametil benzidina (TMB)/peróxido de hidrógeno (KPL), y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se midió una absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microvaloración.

Como resultado, se puede usar cualquier combinación para la medición. Entre todas las combinaciones, una combinación en la que el anticuerpo monoclonal WH10 se recubrió como el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo monoclonal WH2-22-1A o WH63.1 se usó como el segundo anticuerpo que mostró la mayor sensibilidad.

(b) Marcado de anticuerpos monoclonales con enzima

- Los anticuerpos WH2-22-1A y WH63.1 se marcaron con una peroxidasa mediante un procedimiento de Imagawa et al. [Imagawa et al. (1982) J. Appl.Biochem., 4, 41]

(c) Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de sándwich usando anticuerpos monoclonales

La medición de la proteasa de escisión de vWF purificada se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(a), excepto para las siguientes condiciones. El anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP WH10 se recubrió sobre cada pocillo de una placa de 96 pocillos EIA (Nunc) a una concentración de 2 µg/ml. Se usó un plasma combinado humano normal como estándar. El anticuerpo WH2-22-1A o WH63.1 marcado con una peroxidasa en el Ejemplo 1(b) se usó como el segundo anticuerpo. La solución TMB/peroxide de hidrógeno (KPL) se usó como una solución de sustrato. Como solución de parada, se usó ácido sulfúrico 0,5 N. Se midió una absorbancia a 450 nm. El resultado se muestra en la Figura 1. El eje Y en la Figura 1 es una absorbancia a 450 nm. Cuando el plasma combinado humano normal se define como 1 Unidad (U), la proteasa de escisión de vWF que tiene una cantidad de 0,03 U o más se puede medir exactamente, como se muestra en la Figura 1.

(d) Combinación de anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de sándwich de proteasa de escisión de vWF

El anticuerpo monoclonal anti-vWF-CP WH10 se diluyó hasta 2 µg/ml con SSTF, y se añadió a cada pocillo (100 µl por pocillo) de una placa de 96 pocillos EIA (Nunc). La placa se dejó en reposo a 4°C durante toda una noche para revestimiento. Los anticuerpos no unidos se retiraron mediante lavado con SSTF, y se añadieron a cada pocillo 250 µl de SSTF suplementada con 25% de Block Ace (Dainippon pharmaceutical). La placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante el bloqueo. La solución de bloqueo se retiró mediante succión, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de un plasma combinado humano normal. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se retiró mediante lavado con SSTFT, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de 0,5 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-vWF-CP. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se retiró mediante lavado con SSTFT, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de anticuerpo policlonal anti-conejo-IgG marcado con peroxidasa (BioRad) previamente diluido hasta 10000 veces. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar, se añadieron a cada pocillo 100 µl de la solución TMB/peróxido de hidrógeno (KPL). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 N. Se midió una absorbancia a 450 nm de cada solución de reacción se midió usando un colorímetro para la placa de microvaloración.

El resultado se muestra en la Figura 1. La abreviatura "PoAb" descrita en la Figura 1 significa el anticuerpo policlonal. Cuando el plasma combinado humano normal se define como una 1 U, la proteasa de escisión de vWF que tiene una cantidad de 0,03 U o más se puede medir de manera precisa por la combinación usada en este ejemplo, como se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2: Comparación de las concentraciones de la proteasa de escisión de vWF en diversas enfermedades

La proteasa de escisión de vWF en plasma se midió por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de sándwich descrito en el Ejemplo 1(c) o el Ejemplo 1(d). En esta medición, se usó un plasma combinado humano normal como estándar y se define como 1 U.

El resultado obtenido por la combinación de anticuerpos WH10 y WH2-22-1A se muestra en la Figura 2. El resultado obtenido por la combinación de anticuerpos WH10 y WH63.1 se muestra en la Figura 3. El resultado obtenido por la combinación de anticuerpo WH10 y el anticuerpo policlonal se muestra en la Figura 4. El resultado obtenido mediante comparación de las cantidades de proteasa de escisión de vWF en personas sanas y pacientes que padecen diversas enfermedades se muestra en Tabla 1.

Las abreviaturas "LMA", "LPA", "LMC", "SUH", "PTT", "LMA", "LSE", y "TVP" descritas en las Figuras 2 a 4 y la Tabla 1 significan leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome urémico hemolítico, púrpura trombótica trombocitopénica, leucemia linfocítica aguda, lupus sistémico eritematoso y trombosis venosa profunda, respectivamente. Las abreviaturas "MEDIA", "EE", y "normal" descritas en la Tabla 1 significan un valor promedio, un error estándar, y personas sanas, respectivamente. La unidad del eje Y en las Figuras 2 a 4 se calcula a partir de una curva de calibración preparada en base a los resultados obtenidos de diferentes series diluidas del plasma combinado humano normal.

En comparación con la concentración promedio de la proteasa de escisión de vWF en el grupo de las personas sanas (N = 12), la concentración promedio de la proteasa de escisión de vWF en cada grupo de pacientes se redujo de manera significativa, independientemente de las combinaciones de anticuerpos. Además, se confirmó que la concentración de la proteasa de escisión de vWF en pacientes que padecen una enfermedad veno oclusiva (EVO) era menor que en las personas sanas (datos no mostrados).

Tabla 1

	b	normal	LMA	LPA	LMC	PTT	SUH	LLA	c	d	LSE	TVD
a	N=	12	31	10	4	7	5	11	17	18	12	7
WH2-22-1A	MEDIA	1,027	0,555	0,431	0,597	0,356	0,375	0,616	0,711	0,659	0,611	0,584
	EE	0,028	0,110	0,029	0,005	0,005	0,036	0,147	0,104	0,069	0,052	0,074
	p <	-	0,001	0,001	0,001	1E-107	0,001	0,010	0,002	0,001	0,001	0,001
WH63	MEDIA	1,095	0,585	0,623	0,439	0,325	0,387	0,471	0,651	0,573	0,617	0,543
	EE	0,205	0,219	0,184	0,012	0,025	0,036	0,073	0,145	0,131	0,032	0,039
	p <	-	0,005	0,050	0,050	6E-05	0,001	0,001	0,050	0,050	0,005	0,010
P0Ab	MEDIA	0,902	0,614	0,588	0,629	0,388	0,522	0,677	0,742	0,639	0,714	0,714
	EE	0,004	0,082	0,092	0,002	0,063	0,039	0,133	0,086	0,076	0,049	0,052
	p <	-	0,001	0,010	0,001	9E-05	0,020	0,067	0,050	0,001	0,020	0,077
a: Segundo anticuerpo												
b: Grupo de enfermedad												
c: Embolia pulmonar												
d: Infarto cerebral												

Ejemplo 3: Cambios de la proteasa de escisión de vWF antes de diálisis, después de dos horas desde el comienzo de la diálisis, y después de la finalización de diálisis, en pacientes en tratamiento a largo plazo con diálisis con o sin derivación

Se recogieron muestras de sangre de pacientes en tratamiento a largo plazo con diálisis acompañada de derivación repetida, y pacientes en tratamiento a largo plazo con diálisis pero sin derivación de operación. Las muestras de plasma se usaron para medir la proteasa de escisión de vWF mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de sándwich usando la combinación de anticuerpos WH10 y WH2-22-1A descrita en el Ejemplo 1(c). El resultado se muestra en la Figura 5. La unidad del eje Y en la Figura 5 se calcula a partir de una curva de calibración preparada en base a los resultados obtenidos de una serie diluida del plasma combinado humano normal. La abreviatura "PLT<10⁵" descrita en la Figura 5 significa que el número de plaquetas era menor que 1x10⁵/µl.

En comparación con el grupo de pacientes sin derivación de operación, la cantidad de proteasa de escisión de vWF en el grupo de pacientes con derivación repetida de operación se redujo de manera significativa, y el resultado se correlaciona con el hecho de que los pacientes con derivación de operación repetida mostraron trombophilia notable. Además, después de 2 horas del comienzo de la diálisis, la cantidad de proteasa de escisión de vWF se redujo de

manera significativa, en comparación con la de después de finalización de diálisis, y el resultado de acuerdo con las observaciones clínicas de una trombofilia y tendencia a la obturación de derivación durante la diálisis. Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el grado de trombosis se puede detectar en un paciente que padece enfermedades que conducen a trombosis. Además, de acuerdo con el
5 procedimiento de la presente invención, el grado de trombofilia después de diálisis se puede controlar fácilmente en un paciente en tratamiento a largo plazo con diálisis acompañado de derivación repetida. Además, el procedimiento de la presente invención muestra las posibilidades de una predicción de oclusión de derivación o una observación de pronosis.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

10 De acuerdo con la presente invención, se puede detectar trombosis o el grado de trombofilia. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, son posibles diversos cambios y modificaciones obvias para los expertos en la técnica sin salirse del ámbito de las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La Figura 1 es un gráfico que muestra curvas de calibración obtenidas mediante el uso de combinaciones de anticuerpos monoclonales o una combinación de un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el resultado obtenido mediante comparación de las cantidades de proteasa de escisión de vWF en personas sanas y pacientes que padecen diversas enfermedades, en base a la medición que usa la combinación de anticuerpos monoclonales WH10 y WH2-22-1A que se unen específicamente a la proteasa de escisión de vWF.

20 La Figura 3 es un gráfico que muestra el resultado obtenido mediante comparación de las cantidades de proteasa de escisión de vWF en personas sanas y pacientes que padecen diversas enfermedades, en base a la medición que usa la combinación de anticuerpos monoclonales WH10 y WH63.1 que se unen específicamente a la proteasa de escisión de vWF.

25 La Figura 4 es un gráfico que muestra el resultado obtenido mediante comparación de las cantidades de proteasa de escisión de vWF en personas sanas y pacientes que padecen diversas enfermedades, en base a la medición que usa la combinación de a anticuerpo monoclonal WH10 y un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la proteasa de escisión de vWF.

30 La Figura 5 es un gráfico que muestra cambios de la proteasa de escisión de vWF antes de diálisis, después de dos horas del comienzo de diálisis, y después de la finalización de diálisis, en pacientes en tratamiento a largo plazo con diálisis con o sin derivación, en base a la medición que usa la combinación de anticuerpos monoclonales WH10 y WH2-22-1A que se une específicamente a la proteasa de escisión de vWF.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de detección de trombosis o el grado de trombofilia, **caracterizado porque la** medición de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, en el que la trombosis está seleccionada entre el grupo que consiste en leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia promielocítica aguda leucemia linfocítica aguda.
- 5 2. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 1, en el que el grado de trombofilia se detecta en un paciente bajo tratamiento a largo plazo con diálisis acompañado de derivación repetida.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que una disminución de la concentración de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand se usa como un índice, en comparación con el de personas sanas.
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteasa de escisión del factor de von Willebrandis es medida inmunológicamente usando un anticuerpo que específicamente se une a la proteasa de escisión del factor de von Willebrand, o un fragmento del anticuerpo.
- 15 5. Uso de un anticuerpo que específicamente se une a una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, o un fragmento del anticuerpo para la preparación de una composición de diagnóstico para la medición de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand para la detección de trombosis o el grado de trombofilia, en el que la trombosis se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia promielocítica aguda y leucemia linfocítica aguda.

Figura 1

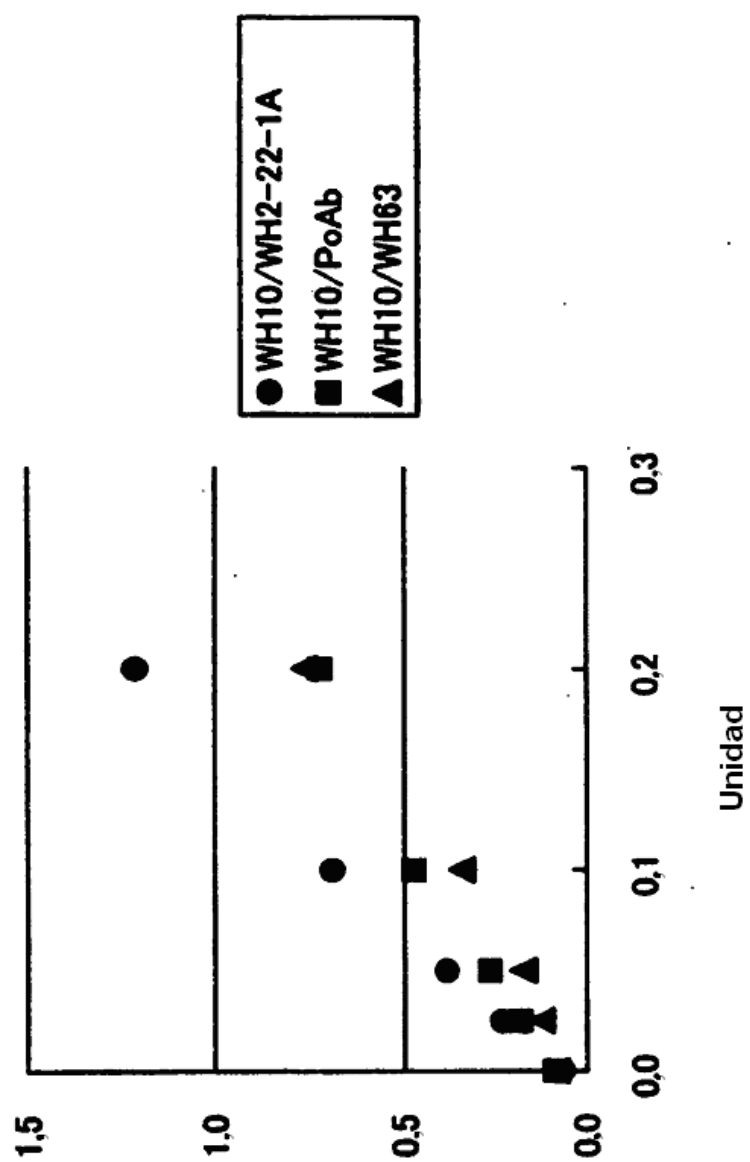


Figura 2

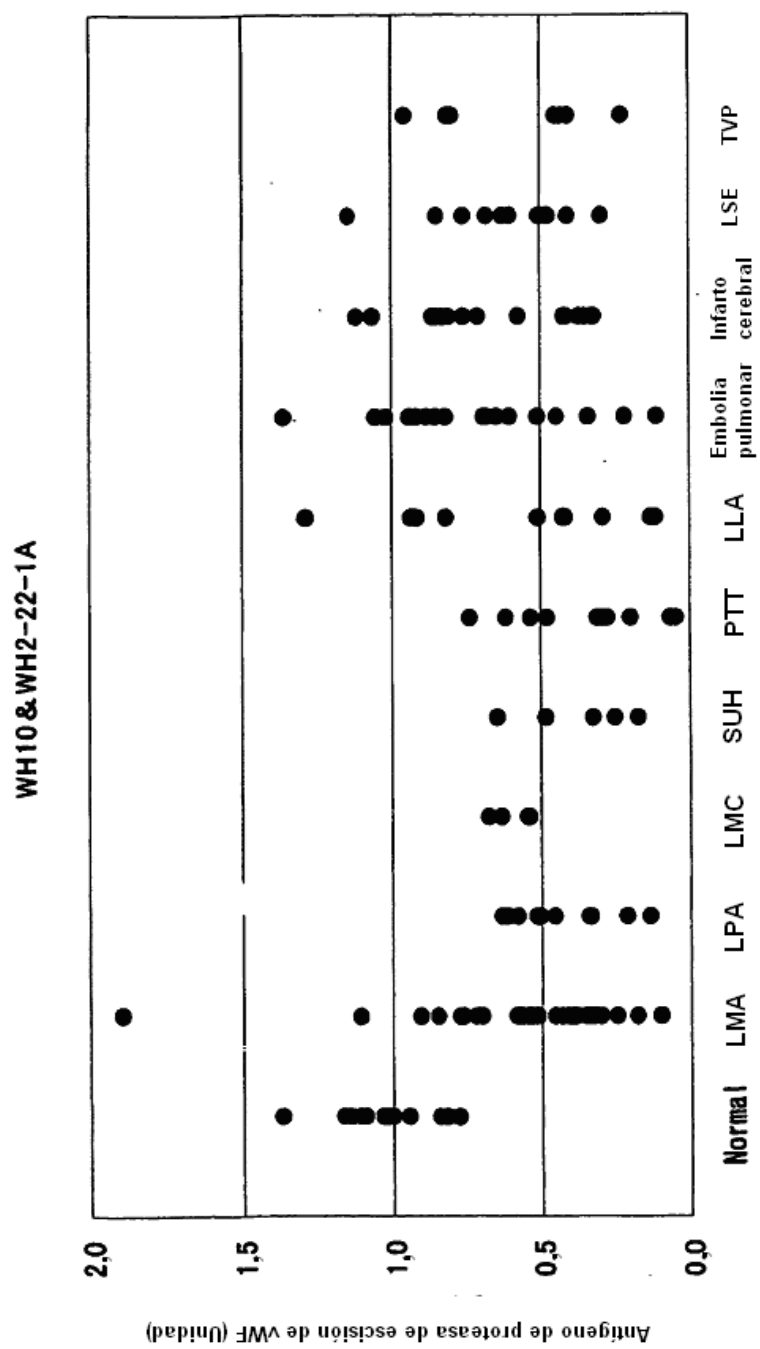


Figura 5

