

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 607**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2005** **E 11151385 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013** **EP 2322646**

54 Título: **Procedimiento para detectar trombosis plaquetaria o fallo orgánico**

30 Prioridad:

08.11.2004 JP 2004323770

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2013

73 Titular/es:

**mitsubishi chemical medience
CORPORATION (100.0%)
2-8 Shibaura 4-chome Minato-ku
Tokyo 108-8559, JP**

72 Inventor/es:

ONO, TOMOKO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 607 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 detectar trombosis plaquetaria o fallo orgánico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar trombosis plaquetaria o fallo orgánico, particularmente en un paciente que padece coagulación intravascular diseminada (CID) o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). De acuerdo con la presente invención puede analizarse una proteasa de escisión del factor de von Willebrand (FVW) y/o un factor de escisión de la misma contenidos en una muestra biológica tal como sangre recogida de un sujeto, particularmente un paciente que padece CID o SRIS, para detectar trombosis plaquetaria o fallo orgánico. La detección de trombosis plaquetaria o fallo orgánico incluye, por ejemplo, la detección o predicción de la formación de un trombo plaquetario, la predicción del desarrollo de trombosis o fallo orgánico (es decir, una evaluación del riesgo de desarrollarse), el dictamen de la presencia o ausencia de trombosis o fallo orgánico, el pronóstico de la trombosis o fallo orgánico, el seguimiento, y la decisión acerca de un tratamiento.

Antecedentes de la técnica

15 En la CID, se forman microtrombos en el sistema microvascular, en presencia de una enfermedad grave subyacente. Los microtrombos dañan la microcirculación y causan una disfunción orgánica o una tendencia a hemorragias. Los síntomas de CID se asocian con SRIS. Se observan los siguientes tres fallos o reacciones en CID:

- (1) La formación de microtrombos causa un fallo microcirculatorio y una diversidad de órganos se vuelven disfuncionales debido a isquemia.
- 20 (2) La formación de microtrombos favorece una coagulopatía de consumo, es decir, el incremento de la producción del factor tisular en la superficie de las células endoteliales conduce a la activación de la ruta extrínseca de la coagulación. Además, se consumen los factores de coagulación y las plaquetas, y se produce una tendencia a hemorragias.
- 25 (3) Hiperfibrinolisis, es decir, el sistema fibrinolítico activado de acuerdo con la activación de la coagulación, genera plasmina, que degrada la fibrina. Cuando el inhibidor de plasmina α_2 ($IP\alpha_2$), que inhibe la plasmina, se consume y desciende a menos del 60% del nivel normal, la plasmina degrada la fibrina y se produce una tendencia a hemorragias.

30 En la CID inducida por sepsis, los monocitos (macrófagos) generan citocinas, tales como factores de necrosis tumoral (TNF- α) o interleucinas (IL-1 β), que activan los neutrófilos. El oxígeno activo y la elastasa producidos por los neutrófilos dañan las células endoteliales vasculares, lo que conduce a la hiperpermeabilidad del endotelio vascular y al espasmo vascular. Como resultado, se daña la microcirculación. Además, se considera que los monocitos *per se* y las células endoteliales vasculares se activan, y producen factores tisulares en la superficie de las células endoteliales para formar microtrombos. Esta formación de microtrombos agrava el fallo microcirculatorio y causa fallo multiorgánico (FMO). Según un concepto popular reciente de SRIS, se considera que este FMO se produce por una reacción inflamatoria sistémica. En el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), las plaquetas se concentran en la circulación pulmonar, y se produce una oclusión de la arteria pulmonar. En el SRIS la reacción inflamatoria no la causan ni una reacción a un antígeno específico ni un aumento de las citocinas. El SRIS es un síndrome en el que la reacción inflamatoria se activa, sin una diana específica, por una reacción no específica con invasión del cuerpo vivo y una producción incontrolada de citocinas que produce FMO grave (referencias no de patente 1 y 2).

40 El SRIS se clasifica en SRIS no infeccioso y sepsis. El SRIS no infeccioso se produce por choque, lesiones, quemaduras, o pancreatitis aguda, y la sepsis se produce por bacteriemia de varias bacterias patógenas, u otras enfermedades infecciosas graves. La sepsis es una respuesta biológica inmune *per se* contra la invasión de un agente patógeno, una lesión de un tejido, o anoxia, y una reacción inflamatoria aguda sistémica y no específica producida por varios mediadores endógenos, independientemente del tipo de invasión. El fallo orgánico que se acompaña por SRIS a veces se produce por una inflamación o isquemia de un tejido, en el estadio temprano. Sin embargo, en el síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM) que se produce por un SRIS prolongado, la sobre-reacción producida por acción de varios mediadores está involucrada en la agravación de las afecciones, y por tanto es difícil predecir el pronóstico del SRIS.

50 En el SRIS, están aumentadas en la sangre ciertas citocinas inflamatorias como el TNF- α , IL-1 (interleucina-1), o IL-6 (interleucina-6). En particular el TNF- α se considera una citocina que activa los neutrófilos y promueve la reacción de coagulación en el SRIS. Cuando la activación de los neutrófilos excede las funciones citoprotectoras de las células endoteliales vasculares, proteasas tales como la elastasa de los neutrófilos o la cathepsina G dañan las células endoteliales vasculares, y por tanto, se daña la microcirculación y se forman microtrombos. Los neutrófilos activados se acumulan no solo en el área irritada, sino también en órganos distantes tales como los pulmones o el hígado (los leucocitos se adhieren fácilmente debido a la baja presión de perfusión). Se considera que la formación de microtrombos produce estasis e isquemia de los tejidos, y, como resultado, se produce FMO. Además los neutrófilos se infiltran en el sistema extravascular para dañar los órganos. Cuando continúa la formación de microtrombos, se consumen los factores de coagulación y las plaquetas. Cuando el estado de SRIS continúa

durante 3 días o más, el paciente se asocia fuertemente a CID. Como se describió anteriormente, la CID está estrechamente relacionada con SRIS.

La elastasa de los neutrófilos es una proteasa neutra que tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 y se localiza en los gránulos azurófilos. En condiciones fisiológicas, la elastasa de los neutrófilos digiere y degrada las bacterias fagocitadas o los cuerpos extraños dentro de los neutrófilos y digiere la elastina, colágeno (tipo III, tipo IV), fibronectina, inmunoglobulinas, o factor XIII de coagulación en el exterior de los neutrófilos, para regular la biosíntesis en los tejidos. En condiciones patológicas, la elastasa de los neutrófilos inactiva componentes biológicos, tales como las fibras elásticas, los proteoglicanos, las fibras de colágeno, la antitrombina III, o el inhibidor de plasmina α_2 . Cuando la elastasa de los neutrófilos actúa en el sitio de unión a la heparina de la antitrombina III para inactivar la antitrombina III, se produce CID. La α_1 -antitripsina (α_1 -AT) es un inhibidor de la elastasa en sangre que durante 3 msec inactiva la elastasa de los neutrófilos. Sin embargo, en un tejido inflamado, se considera que el oxígeno activo, mieloperoxidasa, y/o lactoferrina liberados por los neutrófilos oxidan la α_1 -AT, y por tanto, la elastasa de los neutrófilos no se inactiva y se produce el daño del tejido. Como la elastasa de los neutrófilos muestra una especificidad de sustrato baja, cuando la elastasa de los neutrófilos se libera en exceso o un inhibidor como la α_1 -AT está disminuido, hay una posibilidad de que la elastasa de los neutrófilos degrade los componentes biológicos y dañe sus propios tejidos. Se lesionan las células endoteliales vasculares gravemente dañadas, y las plaquetas se adhieren y se agregan al área lesionada para formar trombos.

Esta adhesión de las plaquetas necesita el FVW humano en el plasma, y desencadena una serie de activaciones plaquetarias incluyendo la agregación de las plaquetas y la liberación de los gránulos intracelulares, y los trombos formados conducen a la hemostasia. En general, el FVW se segrega del endotelio vascular a la sangre como una macromolécula que tiene un peso molecular de más de 20.000 kDa, y es escindido por una metaloproteasa, la proteasa de escisión del FVW, en multímeros de 500 a 20.000 kDa, que circulan por la sangre. En algunos estados de enfermedad (es decir, cuando se produce una alta tensión de corte por oclusión o similar), las estructuras proteínicas del FVW cambian a una estructura extendida. El FVW extendido es resistente a la proteasa de escisión del FVW. Se considera que cuando se producen en exceso las moléculas de FVW "excesivamente largas" en la sangre y se unen a las plaquetas entonces, como resultado, se promueve la agregación plaquetaria en los vasos sanguíneos y se forman trombos en la microcirculación. Esta formación de trombos que involucra las plaquetas es esencial para los mecanismos hemostáticos fisiológicos. Sin embargo, la activación de los factores de coagulación (tales como el factor VII o el factor II) conduce a la formación de trombos por la formación de fibrina y la fusión plaquetaria.

[Referencia 1 no de patente] Bone RC, Critical Care Medicine, U.S.A., 1996, vol. 24, p.1125-1128

[Referencia 2 no de patente] Davies MG y col., British Journal of Surgery, United Kingdom, 1997, vol. 84, p.920-935

35 **Divulgación de la invención**

Problemas a resolver por la invención

Como se describe anteriormente, no se ha informado, con respecto a la formación de trombos que involucra a las plaquetas y la formación de trombos que involucra a la fibrina, de ningún factor que pueda explicar estos mecanismos de formación. Sin embargo, se considera que el mal pronóstico observado en los pacientes con CID o SRIS se puede aliviar clarificando los mecanismos de formación de microtrombos formados por fibrina y plaquetas en el sistema microvascular. Además hay una posibilidad de que el desarrollo del fallo orgánico se pueda prevenir con un tratamiento apropiado en un estadio temprano. El presente inventor ha llevado a cabo estudios intensos, y ha descubierto que la elastasa, plasmina, o trombina degradan la proteasa de escisión del FVW, que los tipos de degradación que se producen por estas proteasas son diferentes, y para completar la presente invención, que la concentración de proteasa de escisión del FVW en el plasma obtenido de pacientes con CID o SRIS en los que un nivel de elastasa es alto, está significativamente disminuida, en comparación con las personas sanas.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de detección de trombosis plaquetaria o fallo orgánico en un sujeto, particularmente en un paciente con CID y SRIS, y un kit para detectar los mismos.

Medios para resolver los problemas

50 El objetivo puede resolverse por la presente invención, es decir, un procedimiento de detección de trombosis plaquetaria o fallo orgánico en un paciente que padece coagulación intravascular diseminada o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, que comprende el análisis de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand y/o un factor de escisión de la misma.

55 De acuerdo con una realización preferida, el factor de escisión es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina, más preferentemente la elastasa.

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

De acuerdo con otra realización preferida, el análisis se lleva a cabo después de la administración de una composición farmacéutica al paciente, conteniendo la composición farmacéutica como un principio activo un antagonista, un inhibidor, un agonista, o un modulador de la actividad de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand.

- 5 De acuerdo con otra realización preferida, el análisis se lleva a cabo después de la administración de una composición farmacéutica al paciente, conteniendo la composición farmacéutica como un principio activo un antagonista, un inhibidor, un agonista, o un modulador de la actividad de una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina.

10 La presente invención se refiere a un kit para detectar la trombosis plaquetaria o el fallo orgánico en un paciente que padece coagulación intravascular diseminada o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteasa de escisión del factor de von Willebrand y/o un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un factor de escisión de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand.

15 Una realización preferida del kit de la presente invención además comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a una proteasa de escisión del factor de von Willebrand escindida por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina.

El término “análisis” como se usa en el presente documento incluye una detección para determinar la presencia o ausencia de la sustancia (por ejemplo, proteasa de escisión del FVW) que se analiza, y una medición para determinar cuantitativa o semicuantitativamente una cantidad de la sustancia que se analiza.

20 Efectos de la invención

La presente invención hace posible una detección de trombosis plaquetaria o fallo orgánico en un sujeto, tal como un paciente que padece CID o SRIS, particularmente CID o SRIS asociados a una enfermedad subyacente tal como leucemia mielóide aguda, cáncer metastásico de pulmón, y/o infección del tracto urinario en la que una concentración de elastasa es alta, y es clínicamente detectable. De acuerdo con la presente invención, la trombosis o el grado de fallo orgánico puede detectarse conveniente, rápida, y específicamente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis de un antígeno proteasa recombinante de escisión del FVW tratado con elastasa.
 La figura 2 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis de un antígeno proteasa recombinante de escisión del FVW tratado con plasmina o trombina.
 La figura 3 es un gráfico que muestra la correlación entre la proteasa de escisión del FVW y la elastasa.
 La figura 4 es un gráfico que muestra la distribución de los niveles de antígeno proteasa de escisión del FVW en grupos de pacientes según sus niveles de elastasa.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

35 [1] Procedimiento de detección de la presente invención

En el procedimiento de la presente invención, la trombosis o el fallo orgánico se pueden detectar o diagnosticar por medición de una cantidad (o concentración) de proteasa de escisión del FVW y/o un factor de escisión de la misma, o una actividad enzimática de los mismos, y comparación del valor obtenido con el de una persona sana. La detección de la trombosis o el fallo orgánico, como se usa en el presente documento, incluye, por ejemplo, la detección o predicción del grado de formación de trombos plaquetarios, la predicción del desarrollo de trombosis o fallo orgánico (es decir, una evaluación del riesgo de desarrollo), el dictamen de la presencia o ausencia de trombosis o fallo orgánico, el pronóstico de trombosis o fallo orgánico, el seguimiento, y la decisión sobre un tratamiento.

45 En el procedimiento de la presente invención, se puede analizar una cantidad (o concentración) de proteasa de escisión del FVW o un factor de escisión de la misma, o una actividad enzimática de lo mismos, y es preferible analizar la cantidad (o concentración). En lo sucesivo, la presente invención se explicará principalmente basándose en la realización preferida en la que se analiza la cantidad (o concentración) de la proteasa de escisión del FVW o un factor de escisión de la misma. La siguiente descripción se puede aplicar a una realización en la que se analiza la actividad enzimática.

50 La expresión “proteasa de escisión del factor de von Willebrand (proteasa de escisión del FVW)” como se usa en el presente documento, significa una metaloproteasa, a veces denominada ADAMTS13, que escinde específicamente el factor de von Willebrand (FVW) en el enlace entre la tirosina (842) y la metionina (843) contenido en un dominio A2 del mismo.

En el procedimiento de la presente invención, una concentración reducida de la proteasa de escisión del FVW puede usarse como índice, en comparación con el de personas sanas. Como se muestra en el Ejemplo 3 que se describe posteriormente, la concentración de la proteasa de escisión del FVW contenida en cada muestra de fluido corporal recogida de pacientes que padecen CID o SRIS, en los que la concentración de elastasa es alta (por ejemplo, 100 ng/ml, o más) está significativamente disminuida (un 50% o más), en comparación con personas sanas. Por tanto, en el procedimiento de la presente invención, cuando la medida de la concentración de proteasa de escisión del FVW en un sujeto a dictaminar es menor que un intervalo normal de personas sanas (por ejemplo, menor que un umbral), se puede dictaminar que el grado de formación de trombos plaquetarios es alto, el riesgo de desarrollo de trombosis o fallo orgánico es alto, y el pronóstico de trombosis o fallo orgánico es malo. Por el contrario, cuando la medida de la concentración de proteasa de escisión del FVW en un sujeto a dictaminar está dentro de un intervalo normal de personas sanas, se puede dictaminar que el grado de formación de trombos es bajo, el riesgo de desarrollo de trombosis o fallo orgánico es bajo, y el pronóstico de trombosis o fallo orgánico es bueno.

No se limita el sujeto al que se pueda aplicar el procedimiento de la presente invención, en tanto en cuanto el sujeto necesite la detección de un grado de formación de trombos plaquetarios, o una predicción del desarrollo o pronóstico de trombosis o fallo orgánico (por ejemplo, daño renal o daño hepático, preferentemente daño renal). Como sujeto, se puede mencionar, por ejemplo, un paciente que padece CID o SRIS, preferentemente un paciente que padece CID o SRIS en el que la concentración de elastasa es alta, tal como un paciente que padece CID o SRIS asociado con una enfermedad subyacente tal como leucemia (tal como leucemia mieloide aguda), una infección (tal como una infección del tracto urinario), o un cáncer (tal como el cáncer metastásico de pulmón).

En la trombosis, la sangre se coagula en un vaso sanguíneo, que se estrecha o se bloquea completamente por los trombos que se adhieren a la pared del vaso, y entonces el enlentecimiento del flujo sanguíneo daña un tejido o un órgano. Cuando un vaso se lesiona, las plaquetas de la sangre se acumulan en la herida y conducen a la hemostasia. Después, la fibrina de la sangre se agrega encima para formar trombos, que completan la hemostasia, y el vaso se repara por proliferación de las células de la pared vascular. En condiciones normales, estos trombos se lisan por los componentes que pueden actuar sobre los trombos, y el flujo sanguíneo se restablece. La trombosis es una enfermedad en la que dicho sistema fibrinolítico no funciona adecuadamente, y los trombos inhiben o bloquean completamente el flujo sanguíneo. Se considera que un quinto de las personas a los cuarenta, un tercio de las personas a los cincuenta, la mitad de las personas a los sesenta y todas las personas a los setenta, padecen trombosis. Se pueden mencionar como síntomas principales de trombosis, por ejemplo, trombosis cerebral, embolia cerebral, o ataque isquémico transitorio en el cerebro; tromboembolia pulmonar en los pulmones; angina de pecho, infarto de miocardio, o trombosis intra-auricular en el corazón; o trombosis mesentérica o trombosis profunda venosa (síndrome de la clase turista).

En el procedimiento de la presente invención, la detección y/o predicción se puede llevar a cabo recogiendo muestras de un sujeto, tal como un paciente que padezca CID o SRIS, y de una persona sana, midiendo las concentraciones de proteasa de escisión del FVW que contienen las muestras, y comparando los valores medidos. En general, es preferible que las muestras recogidas de personas sanas se usen para determinar un intervalo normal de concentración de proteasa de escisión del FVW, o un umbral de la misma para el dictamen previo. Cuando se establece de antemano el intervalo normal o el umbral para el dictamen previo, la detección y/o la predicción en un sujeto se puede llevar a cabo analizando solamente la proteasa de escisión del FVW de la muestra recogida del sujeto. El intervalo normal o el umbral para el dictamen se considera que depende de varias condiciones, tales como una enfermedad subyacente, el sexo o la edad. Sin embargo, los expertos en la materia, pueden determinar fácilmente el intervalo normal o el umbral para el dictamen, seleccionando una población apropiada estadísticamente correspondiente al sujeto y procesando estadísticamente los datos obtenidos de esa población.

En el procedimiento de la presente invención no se limita el procedimiento del análisis de la proteasa de escisión del FVW, en tanto en cuanto se pueda determinar cuantitativa o semicuantitativamente una cantidad de proteasa de escisión del FVW, o se pueda dictaminar la presencia o la ausencia de una proteasa de escisión del FVW por el procedimiento de análisis. Se puede mencionar como procedimiento de análisis, por ejemplo, un procedimiento inmunológico utilizando un anticuerpo anti-proteasa de escisión del FVW o un fragmento del mismo (tal como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, un inmunoensayo de aglutinación en látex, un inmunoensayo de quimioluminiscencia, un procedimiento de anticuerpo fluorescente, un radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, tinción inmunohistoquímica, o transferencia de Western), un procedimiento bioquímico (tal como un procedimiento enzimológico), o un procedimiento biológico molecular para la medición de un ARNm.

Cuando se utiliza un procedimiento inmunológico para analizar la proteasa de escisión del FVW, se puede preparar un anticuerpo anti-proteasa de escisión del FVW o un fragmento del mismo de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como un procedimiento descrito en el documento WO 2004/029242. Cada inmunoensayo puede llevarse a cabo de acuerdo con, por ejemplo, el documento WO 2004/029242.

Como procedimiento de medición de la proteasa de escisión del FVW, es preferible un procedimiento inmunológico desde el punto de vista de la sensibilidad y la conveniencia. Procedimiento inmunológico significa un procedimiento de análisis de la proteasa de escisión del FVW por un procedimiento de ELISA, un procedimiento en látex, inmunocromatografía, o similares, utilizando un anticuerpo contra la proteasa de escisión del FVW. Se pueden

mencionar como procedimientos inmunológicos, por ejemplo, un procedimiento de competición que utiliza una proteasa de escisión del FVW marcada, un procedimiento sándwich que utiliza un anticuerpo marcado, un procedimiento de perlas de látex en el que se observa la aglutinación de perlas revestidas con un anticuerpo, y un procedimiento que utiliza un anticuerpo conjugado con una partícula con color tal como coloide de oro. Cualquier procedimiento que utilice un anticuerpo contra la proteasa de escisión del FVW se incluye en las realizaciones preferidas de la presente invención. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Se puede utilizar un fragmento de anticuerpo, tal como el Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv.

Una muestra preferida para ensayarse por el procedimiento de la presente invención es, por ejemplo, plasma sanguíneo. Como muestras distintas de plasma, se pueden mencionar, por ejemplo, varios fluidos corporales, tales como fluidos de células o tejidos, linfa, fluido tímico, líquido ascítico, líquido amniótico, jugos gástricos, orina, jugos pancreáticos, líquido raquídeo, o saliva. El plasma preferentemente es plasma citrado o heparinizado.

En el procedimiento de la presente invención, se puede analizar un factor de escisión de la proteasa de escisión del FVW, junto con el análisis de la proteasa de escisión del FVW, o independientemente del análisis de la proteasa de escisión del FVW. Como factor de escisión se puede analizar, por ejemplo, al menos una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina. Como se muestra en los Ejemplos 1 y 2 descritos posteriormente, el presente inventor descubrió que la proteasa de escisión del FVW era escindida por la elastasa, la plasmina, o la trombina, y que los tipos de escisión eran diferentes. Por tanto, un descenso de la proteasa de escisión del FVW se produce por la escisión de la proteasa de escisión del FVW por la elastasa, plasmina, o trombina.

En el procedimiento de la presente invención, se puede analizar una proteasa de escisión del FVW o un factor de escisión de la misma para detectar trombosis plaquetaria o fallo orgánico. Se puede llevar a cabo una detección o predicción más precisa analizando ambos, la proteasa de escisión del FVW y el factor de escisión (es decir, la proteasa).

En el procedimiento de la presente invención, un cambio en la concentración de la proteasa (es decir, del factor de escisión) se puede utilizar como un índice, en comparación con el de personas sanas.

La concentración de proteasa se puede medir por varios procedimientos conocidos, descritos posteriormente. En la sangre, más del 90% de la elastasa se encuentra en forma de complejo con la α 1-antitripsina. Este complejo se puede medir por un procedimiento ELISA usando un anticuerpo monoclonal. La trombina generada en la sangre no se puede medir directamente, debido a que varios factores la neutralizan rápidamente. Sin embargo, se puede predecir aproximadamente una cantidad de trombina como complejo de trombina y antitrombina III (TAT). Como en el caso de la trombina, la plasmina no puede medirse directamente, debido a que desaparece rápidamente de la sangre. Sin embargo, se puede medir una cantidad de plasmina como complejo de plasmina y α 2-antiplasmina (PIC). Los complejos TAT o PIC se pueden medir, por ejemplo, por un procedimiento ELISA o un procedimiento de aglutinación en látex utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales.

El procedimiento de la presente invención se puede utilizar para el seguimiento del estado del paciente (por ejemplo, una evaluación del grado de formación de trombos plaquetarios, o una predicción del desarrollo o pronóstico de trombosis o fallo orgánico) tras la administración de una composición farmacéutica al paciente. La composición farmacéutica que puede utilizarse en la presente invención no está limitada, y puede mencionarse, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene como principio activo un antagonista, un inhibidor, un agonista o un modulador de la actividad de la proteasa de escisión del FVW, o una composición farmacéutica que contiene como principio activo un antagonista, un inhibidor, un agonista o un modulador de la actividad de una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina.

Con respecto al control de la formación de trombos plaquetarios o trombos de fibrina, el presente inventor considera que la elastasa escinde la proteasa de escisión del FVW para formar trombos plaquetarios y que después la fibrina se adhiere para formar trombos de fibrina, y la plasmina y/o trombina segregadas entonces, escinden la proteasa de escisión del FVW, basándose en la diferencia mencionada anteriormente entre los tipos de escisión de la proteasa de escisión del FVW por cada proteasa. Por ejemplo, es posible dictaminar precisamente las afecciones sabiendo cual proteasa afecta al cambio en la cantidad de proteasa de escisión del FVW.

Por ejemplo, cuando se observa una cantidad aumentada de elastasa y una cantidad disminuida de proteasa de escisión del FVW, se puede dictaminar que se trata del estadio temprano en el que el trombo plaquetario se ha formado. Cuando se observa una cantidad aumentada de plasmina o trombina y una cantidad disminuida de proteasa de escisión del FVW, se puede dictaminar que se trata del estadio tardío en el que el trombo de fibrina ya se ha formado. Se puede seleccionar un tratamiento más apropiado entendiendo con mayor precisión las condiciones de la enfermedad. El índice más preferible es la elastasa, debido a que tiene la actividad más alta en la escisión de la proteasa de escisión del FVW y está involucrada en el estadio temprano.

[2] Kit de detección de la presente invención

El kit de la presente invención comprende al menos un anticuerpo anti-proteasa de escisión del FVW o un fragmento del mismo, y/o un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un factor de escisión de la

proteasa de escisión del FVW. Es preferible que el kit de la presente invención comprenda dos o más tipos de anticuerpos anti-proteasa de escisión del FVW y/o dos o más tipos de anticuerpos anti-factor de escisión. El kit de la presente invención además comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteasa de escisión del FVW escindida por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina. El kit de la presente invención se puede usar para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

El anticuerpo anti-proteasa de escisión del FVW o el anticuerpo anti-factor de escisión contenido en el kit de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Cuando el kit contiene dos o más tipos de anticuerpos anti-proteasa de escisión del FVW o dos o más tipos de anticuerpos anti-factor de escisión, uno de los anticuerpos se puede marcar como un segundo anticuerpo, o se puede añadir al kit además un anticuerpo marcado anti-segundo anticuerpo.

Ejemplos

La presente invención ahora se ilustrará además, sin limitarse a estos, por los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Degradación del antígeno proteasa recombinante de escisión del FVW por la elastasa

Después de disolverse 1,5 μg de una proteasa recombinante de escisión del FVW en una solución salina fisiológica/tampón Tris, se añadió elastasa a la solución para alcanzar una concentración final de 20 nmol/l o 140 nmol/l. Cada mezcla se incubó a 37 °C, y se recogieron alícuotas correspondientes a 0,5 μg de proteasa de escisión del FVW después de 15 min y 1 hora desde el principio de la incubación. Las muestras recogidas se sometieron a una electroforesis SDS (al 5-20% de gel) bajo condiciones no reducidas, y se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) por transferencia de Western. La membrana se bloqueó con un agente bloqueante comercial (Block Ace; Dainippon pharmaceutical) a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se lavó con tampón Tris. La membrana se incubó en una solución de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo monoclonal anti-proteasa de escisión del FVW (WH2-22-1A: epítipo = una región desintegrina de la proteasa de escisión del FVW)/tampón Tris (pH 7,4)/Block Ace al 10%, a temperatura ambiente durante 1 hora, y se lavó tres veces con una solución de tampón Tris (pH 7,4)/NP-40 al 0,05%. La membrana se incubó además en una solución de un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP (peroxidasa de rábano rusticano) (BioRad) diluido 1/2000/Tampón Tris (pH 7,4)/Block Ace al 10% a temperatura ambiente durante 1 hora, y se lavó tres veces con una solución de tampón Tris (pH 7,4)/NP-40 al 0,05%. Se llevó a cabo una reacción colorante utilizando una solución TMB (Pierce). Los resultados se muestran en la Figura 1.

Las condiciones de reacción en cada calle que se muestran en la Figura 1 son las siguientes:

- Calle 1: Reacción sin elastasa
- Calle 2: Reacción a 37 °C durante 15 minutos con elastasa 20 nmol/l
- Calle 3: Reacción a 37 °C durante 15 minutos con elastasa 140 nmol/l
- Calle 4: Reacción sin elastasa
- Calle 5: Reacción a 37 °C durante 1 hora con elastasa 20 nmol/l
- Calle 6: Reacción a 37 °C durante 1 hora con elastasa 140 nmol/l

En la reacción a 37 °C con elastasa 20 nmol/l, la mayoría de la banda de los 160 kDa de la proteasa de escisión del FVW se escindió en la banda de 50 kDa tras 15 minutos, y la banda de 160 kDa y la mayoría de la banda de 50 kDa desaparecieron tras 1 hora, desde el principio de la reacción. En la reacción con elastasa 140 nmol/l, toda la banda de 160 kDa desapareció por la incubación de 15 minutos o más. Este resultado sugiere que la proteasa de escisión del FVW se degradó dependiendo del tiempo y de la concentración de elastasa.

Ejemplo 2: Degradación del antígeno proteasa recombinante de escisión del FVW por plasmina o trombina

Después de la disolución de 1,5 μg de una proteasa recombinante de escisión del FVW en una solución salina fisiológica/tampón Tris, se añadió a la solución una combinación de plasminógeno (a una concentración final = 1 $\mu\text{mol}/\text{l}$) y un activador del plasminógeno tisular (a una concentración final = 0,2 nmol/l o 2 nmol/l), o trombina (concentración final = 20 mU o 200 mU). Cada mezcla se incubó a 37 °C, y se recogieron alícuotas correspondientes a 0,5 μg de la proteasa de escisión del FVW a los 15 minutos y 1 hora desde el principio de la incubación. Las muestras recogidas se sometieron a una electroforesis SDS, y se llevó a cabo la transferencia de Western, como se describe en el Ejemplo 1, para detectar las bandas de la proteasa de escisión del FVW. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Las condiciones de reacción en cada calle mostradas en la Figura 2 son las siguientes:

- Calle 1: Reacción a 37 °C durante 15 minutos con activador del plasminógeno tisular (tPA) 0,2 nmol/l
- Calle 2: Reacción a 37 °C durante 15 minutos con tPA 2 nmol/l
- Calle 3: Reacción a 37 °C durante 15 minutos con trombina 2 nmol/l
- Calle 4: Reacción a 37 °C durante 15 minutos con trombina 200 nmol/l
- Calle 5: Reacción sin proteasas

Calle 6: Reacción a 37 °C durante 1 hora con activador del plasminógeno tisular (tPA) 0,2 nmol/l
 Calle 7: Reacción a 37 °C durante 1 hora con tPA 2 nmol/l
 Calle 8: Reacción a 37 °C durante 1 hora con trombina 20 nmol/l
 Calle 9: Reacción a 37 °C durante 1 hora con trombina 200 nmol/l

- 5 En cualquier caso de plasmina o trombina, se produjo muy poca escisión de la banda de los 160 kDa en 15 minutos. En la reacción a 37 °C con plasmina durante una hora, las bandas de 130 kDa y 100 kDa, que se consideraron productos de degradación de la proteasa de escisión del FVW, aparecieron además de la banda de los 160 kDa, independientemente de las concentraciones de plasmina añadida. En la reacción con trombina durante 1 hora, apareció la banda de 130 kDa cuando se añadieron 200 mU de trombina. Este resultado indicaba que la plasmina y trombina escindieron la proteasa de escisión del FVW en el mismo sitio, pero en diferentes tiempos de escisión.

Ejemplo 3: Correlación de la proteasa del FVW con la elastasa

- 15 En este ejemplo, las muestras de plasma recogidas de personas sanas, pacientes con CID, y pacientes con SRIS se usaron para medir las cantidades de antígeno proteasa de escisión del FVW y elastasa que contenían las mismas. Se midió la cantidad de antígeno proteasa de escisión del FVW utilizando un kit disponible comercialmente (VWFcleaving protease ELISA kit; Mitsubishi Kagaku Iatron). Se determinó la cantidad de elastasa midiendo una cantidad de elastasa/ α 1-antitripsina utilizando un kit disponible comercialmente (PMN Elastase/(1-PI Complex ELISA Kit; CALBIOCHEM).

- 20 Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. En la Figura 3, el eje X indica cantidades de elastasa/ α 1-antitripsina (unidades=ng/ml), y el eje Y indica las cantidades de antígeno proteasa de escisión del FVW (unidades=%). En la Figura 4, la abreviatura N.S. significa que no existían diferencias significativas entre ellas. Había una correlación negativa entre la cantidad de elastasa/ α 1-antitripsina y la cantidad de antígeno proteasa de escisión del FVW ($y=-0,1382x + 74,643$; $R^2=0,1549$). Este resultado indicaba que la cantidad de antígeno proteasa de escisión del FVW disminuía, debido a la degradación del antígeno proteasa de escisión del FVW por la elastasa, en un paciente con un nivel aumentado de elastasa/ α 1-antitripsina, es decir, un paciente en estado de FMO en el que el daño tisular progresa. Además, la cantidad de antígeno proteasa de escisión del FVW en pacientes con un nivel de elastasa de 100 ng/ml o más era de $46,4\pm 23,2\%$ (Media \pm DS), mientras que en pacientes con un nivel de elastasa de 50 ng/ml o menos fue de $71,7\pm 29,0\%$. Se descubrió gracias a estos resultados que la cantidad de antígeno proteasa de escisión del FVW disminuía significativamente en los pacientes con un nivel de elastasa de 100 ng/ml o más ($P<0,05$).

30 Aplicabilidad industrial

- 35 Las citocinas tales como el TNF- α activan los neutrófilos y promueven la reacción de coagulación, y las proteasas tales como la elastasa de los neutrófilos o la catepsina G dañan las células endoteliales vasculares. De acuerdo con los hallazgos clarificados por la presente invención, en tales condiciones, la elastasa liberada en la sangre, para reparar el tejido dañado, escinde activamente la proteasa de escisión del FVW, así como promueve la formación de trombos plaquetarios. Además, se ha sugerido que cuando se promueve la reacción de coagulación, la fibrina se agrega sobre los trombos plaquetarios, y el sistema de plasmina empieza a trabajar, la plasmina escinde la proteasa de escisión del FVW (después de la anterior escisión por la elastasa) y conduce a la formación de microtrombos formados por plaquetas y fibrina en el sistema microvascular, desarrollándose la CID o SRIS. Estos hallazgos se consideran la primera sugerencia de que el control de la proteasa de escisión del FVW por las serin proteasas está involucrado en la formación de trombos plaquetarios y trombos de fibrina. Hay varias trombosis en las que el mecanismo no puede explicarse basándose solo en los productos de degradación de los trombos de fibrina. Hay una posibilidad de que la presente invención pueda clarificar el mecanismo de tales trombosis. La presente invención puede aplicarse al uso para la detección de trombosis plaquetaria o fallo orgánico en un sujeto tal como los pacientes con CID o SRIS.

- 45 Los pacientes que padecen de CID a menudo desarrollan afecciones que muestran un pronóstico malo, tales como enfermedades malignas o enfermedades graves, y complican los síntomas. En la CID, en presencia de varias enfermedades subyacentes, el sistema de coagulación está activado o los factores reguladores de la coagulación están disminuidos, y como resultado, se forman muchos microtrombos en el sistema microvascular que producen oclusión intravascular. Además, en la CID, en adición a la formación de trombos se desarrolla el trastorno de hemostasia de consumo causado por consumo de las plaquetas y los factores de coagulación y fibrinólisis, y se observa una grave tendencia a hemorragias y/o fallo orgánico. Por tanto, es muy importante detectar la formación de microtrombos en el estadio temprano para llevar a cabo un tratamiento temprano. Un diagnóstico predictivo de fallo orgánico en el estadio temprano en SRIS es útil como se describe posteriormente. La tasa de supervivencia de los casos que desarrollan FMO no es alta, y hay casos en los que los síntomas no se alivian incluso cuando se someten a cuidados altamente intensivos. Por tanto, es muy importante detectar un signo de aviso que muestre la transferencia a fallo orgánico tan pronto como sea posible, para prevenir el desarrollo de un fallo orgánico. Es decir, es necesario dictaminar con precisión la afección y/o la severidad del estado de SRIS, para tomar las medidas apropiadas de tratamiento. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, es posible hacer diversos cambios y modificaciones obvias para los expertos en la materia sin salirse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de predicción de la cantidad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand en un paciente que padece coagulación intravascular diseminada o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 analizar una muestra de un fluido corporal del paciente para un factor de escisión de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand, en el que dicho factor es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina y trombina, en el que un incremento de la cantidad de dicho factor de escisión es indicativo de un descenso de la cantidad de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
- 10 analizar la muestra para dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand; y confirmar que la predicción es correcta.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
- 15 analizar la muestra para dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand; y diagnosticar el paciente con trombosis plaquetaria, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de trombosis plaquetaria.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
- analizar la muestra para dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand; y diagnosticar el paciente con fallo orgánico, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de fallo orgánico.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
- analizar la muestra para dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand; y determinar una opción apropiada de tratamiento, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de la utilización de un inhibidor de dicho factor de escisión.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho factor de escisión es la elastasa.
7. El procedimiento de predicción de la cantidad de un factor de escisión de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, en el que dicho factor de escisión es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina y trombina, en un paciente que padece coagulación intravascular diseminada o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, comprendiendo dicho procedimiento:
- 30 analizar una muestra de fluido corporal de un paciente para dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand, en el que un descenso de la cantidad de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand es indicativo de un incremento de la cantidad de dicho factor de escisión.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además:
- 35 analizar la muestra para dicho factor de escisión; y confirmar que la predicción es correcta.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además:
- analizar la muestra para dicho factor de escisión; y diagnosticar el paciente con trombosis plaquetaria, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de trombosis plaquetaria.
- 40 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además:
- analizar la muestra para dicho factor de escisión; y diagnosticar el paciente con fallo orgánico, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de fallo orgánico.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además:
- 45 analizar la muestra para dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand; y determinar una opción apropiada de tratamiento, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de la utilización de un inhibidor de dicho factor de escisión.

12. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 11, en el que dicho factor de escisión es la elastasa.

13. Un procedimiento de determinación de una opción apropiada de tratamiento para un paciente que padece coagulación intravascular diseminada o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 determinar la cantidad de una proteasa de escisión del factor de von Willebrand, y la cantidad de un factor de escisión de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand, en el que dicho factor de escisión es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, plasmina, y trombina, en el paciente; y
- 10 elegir una opción de tratamiento, en el que un incremento de dicho factor de escisión y un descenso de dicha proteasa de escisión del factor de von Willebrand son indicativos de la utilización de un inhibidor de dicho factor de escisión.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho factor de escisión es la elastasa.

Figura 1



Figura 2

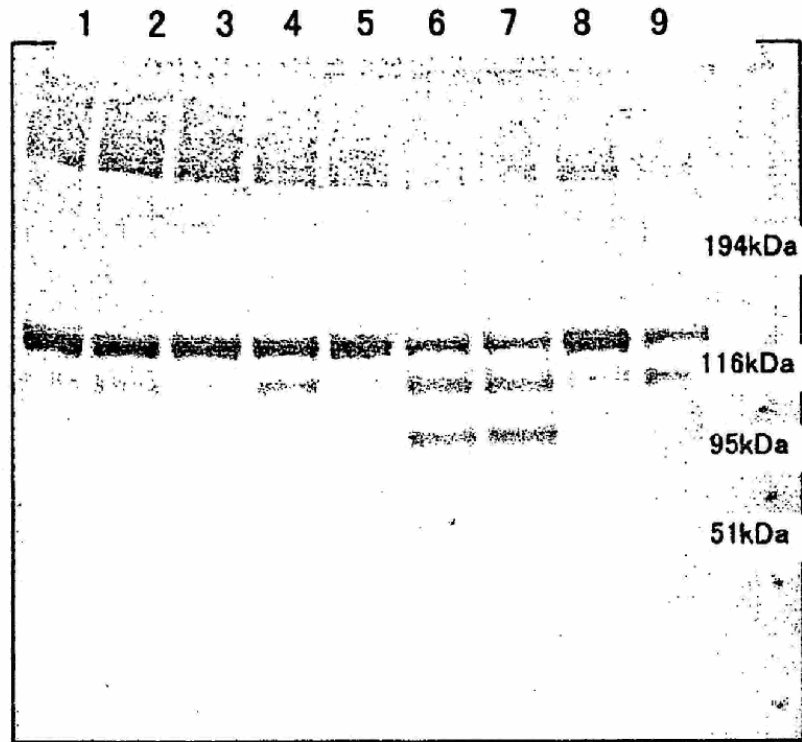


Figura 3

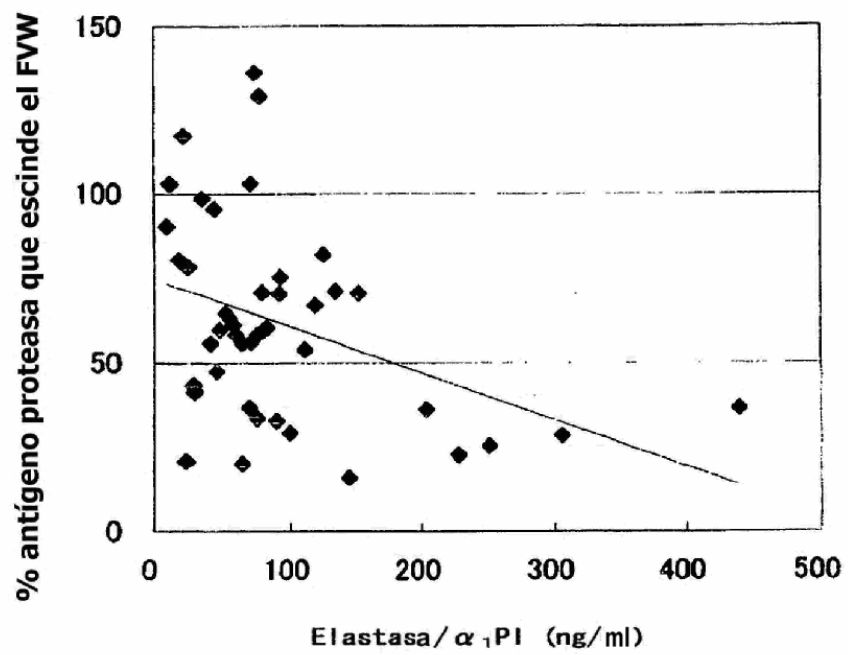


Figura 4

