

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 952**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2018 PCT/FR2018/051854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019 WO19016485**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2018 E 18752824 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.06.2021 EP 3655014**

54 Título: **Clusterina para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas**

30 Prioridad:

21.07.2017 FR 1756912

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

09.12.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (16.6%)

35 Place Pey Berland

33000 Bordeaux, FR;

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (16.6%);

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE

BORDEAUX (16.6%);

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET

DE LA RECHERCHE MÉDICALE (16.6%);

UNIVERSITÉ D'ANGERS (16.6%) y

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

D'ANGERS (16.6%)

72 Inventor/es:

AUGUSTO, JEAN-FRANÇOIS;

CONTIN-BORDES, CÉCILE;

DELMAS, YAHSOU;

BLANCO, PATRICK;

DELNESTE, YVES;

JEANNIN, PASCALE y

BEAUVILLAIN, CÉLINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 883 952 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

Clusterina para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de una proteína para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas, así como a un método ex vivo para estratificar a un paciente que padece MAT o que probablemente lo tenga.

10 Estado de la técnica

15 El nombre de microangiopatía trombótica (MAT) incluye un conjunto de enfermedades raras caracterizadas por la aparición de lesiones endoteliales que resultan en la oclusión de vasos de pequeño calibre por trombosis y que resultan en isquemia tisular. La isquemia tisular es responsable de la destrucción celular y la liberación al ambiente extracelular por las células muertas de moléculas normalmente confinadas en la célula. Estas peligrosas moléculas son proinflamatorias y tienen una acción citotóxica para las células del huésped. Datos recientes identifican a las histonas (en forma libre o complejadas con ADN) como moléculas peligrosas cuyo papel es central en MAT.

20 Los MAT son patologías potencialmente mortales, siendo el riñón y el cerebro los órganos diana afectados con mayor frecuencia. Las formas más comunes de MAT son la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y el síndrome urémico hemolítico (SUH), que pueden estar asociados con bacterias o no con bacterias. El SUH asociado con bacterias es la forma más común de SUH (90% de los SUH); actualmente se sabe que varias cepas de bacterias (*Escherichia coli* O157: H7; shigella, neumococos, *Escherichia coli* O104 en particular) causan enfermedades al secretar una toxina llamada toxina shiga. El SUH no asociado con bacterias representa aproximadamente el 10% de los SUH donde se encuentra con frecuencia en el contexto de susceptibilidad genética.

25 El número de casos nuevos de PTT es de 5 a 10 casos por millón de habitantes por año. La frecuencia de SHU también está muy cerca de estos valores.

30 Los MAT incluyen, además de estas formas más clásicas, el síndrome HELLP, que es una complicación grave o una variante de la preeclampsia en mujeres embarazadas, caracterizada por hemólisis, aumento de las enzimas hepáticas y bajo recuento de plaquetas. También existen formas secundarias de MAT que ocurren en un contexto específico, como por ejemplo durante ciertos tratamientos, durante la quimioterapia, durante el cáncer o durante un trasplante alogénico de médula ósea.

35 El tratamiento actual de las formas más clásicas se realiza generalmente mediante intercambios de plasma al inicio del tratamiento, con la excepción del SUH asociado con una toxina shiga que se presenta en niños. Los intercambios plasmáticos tienen como objetivo proporcionar grandes volúmenes de plasma obtenidos de donantes voluntarios y que contienen la proteína ADAMTS13 (en PTT) o proteínas del complemento (en SUH). A menudo se le asocian otros tratamientos, en particular los corticosteroides. Cuando son efectivos, los intercambios de plasma se continúan hasta una normalización duradera del recuento de plaquetas (al menos 48 horas) y luego se espacian gradualmente. Sin embargo, en muchos casos los recambios plasmáticos resultan ineficaces.

45 En situaciones donde la respuesta al tratamiento estándar no es óptima, se agregan tratamientos adicionales. El tratamiento más utilizado en este contexto, un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab), tiene como objetivo luchar contra la producción de anticuerpos por parte del paciente mediante la destrucción transitoria de los linfocitos B. Su uso es más frecuente en el contexto de protocolos terapéuticos y en consulta con el centro de referencia.

50 En pacientes con el denominado SUH idiopático atípico, el tratamiento comprende fármacos capaces de bloquear las proteínas del complemento en el origen de la enfermedad. El eculizumab es actualmente el único tratamiento autorizado para la indicación del SUH atípico. Este tratamiento es sumamente caro ya que un vial de 300 mg de Eculizumab cuesta más de 4000 euros y en mantenimiento la dosis es de 1200 mg por 14 días.

55 Aunque a menudo son eficaces, estos tratamientos tienen un inicio de acción retardado que es variable entre individuos y según la naturaleza de la MAT. Sin embargo, el diagnóstico etiológico puede tardar varios días/semanas. Así, si tomamos el ejemplo de la PTT, la mortalidad actualmente se mantiene en torno al 15%.

60 Por lo tanto, existe una necesidad real de nuevos tratamientos, que superen estos defectos, inconvenientes y obstáculos del estado de la técnica, en particular actuando más rápidamente y sea cual fuere la etiología de la enfermedad, para permitir reducir la mortalidad de la fase aguda de MAT que es principalmente precoz.

Descripción de la invención

65 Después de una extensa investigación, los inventores han logrado resolver este problema técnico.

Sorprendentemente, los inventores han demostrado que la clusterina se une a las histonas y que inhibe su acción inflamatoria y citotóxica.

De hecho, los inventores han demostrado que la clusterina se une a histonas, moléculas peligrosas con un papel central en MAT. También demostraron que la clusterina neutraliza las acciones de las histonas, por un lado bloqueando la producción de moléculas proinflamatorias, en particular citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α por monocitos humanos, y, por otro lado, bloqueando la inducción de la muerte de las células endoteliales, en particular neutralizando la capacidad de las histonas para inducir la muerte de las células endoteliales. Los inventores también han demostrado que la adición de clusterina a sueros de pacientes que contienen histonas disminuye su toxicidad frente a las células endoteliales.

Además, los inventores han demostrado que el nivel de clusterina está correlacionado con el estado de salud de los pacientes que padecen MAT. Pudieron demostrar que los niveles de clusterina sérica son más bajos en pacientes con MAT en el momento del diagnóstico que en sujetos sanos.

La invención podría facilitar el manejo de MAT para los que los tratamientos actuales dependen de la etiología. Por tanto, el uso de clusterina podría ofrecerse a cualquier paciente con MAT independientemente de la etiología, permitiendo un tratamiento más rápido independientemente del diagnóstico etiológico.

Por lo tanto, un primer objeto se refiere a la clusterina para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas.

La clusterina (Clu), también llamada apolipoproteína J, es una glicoproteína heterodimérica soluble de 80 kDa unida por puentes disulfuro, altamente conservada durante la evolución y entre mamíferos. La clusterina es abundante en fluidos fisiológicos (a concentraciones que varían de 100 a 300 μ g/ml en suero humano a modo de ejemplo) y se induce en respuesta a una amplia variedad de daños celulares y tisulares. Se sabe que la clusterina tiene actividad de chaperona y es un homólogo funcional de pequeñas proteínas de choque térmico intracelulares (HSP). Se une a los dominios hidrofóbicos de proteínas no nativas y las dirige para la internalización mediada por receptores y la degradación lisosomal intracelular. Esta función permite que la clusterina interactúe con un amplio espectro de moléculas, como lípidos, componentes del sistema del complemento, proteínas formadoras de placas amiloides e inmunoglobulinas.

El término "clusterina" tiene, en el contexto de la presente invención, su significado general y denota una glicoproteína como se describió anteriormente. La clusterina puede ser clusterina animal o clusterina humana. Puede ser una clusterina elegida del grupo que comprende una clusterina plasmática, una clusterina recombinante y una clusterina sintética.

La clusterina plasmática puede obtenerse mediante purificación a partir de plasma, en particular humano, mediante cualquier método de purificación conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante inmunoafinidad, intercambio catiónico, fraccionamiento de plasma y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

La clusterina recombinante puede obtenerse mediante técnicas estándar de ADN recombinante, bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica una clusterina puede introducirse mediante un vector en el genoma de una especie productora, como una bacteria, una célula de mamífero cultivada o un animal transgénico. Los vectores que permiten la introducción, el mantenimiento y la expresión de genes en una célula huésped son conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, poseen secuencias esenciales para la expresión del gen introducido, tales como secuencias promotoras, secuencias de poliadenilación y genes de selección. Dichos vectores se pueden elegir entre los conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, entre adenovirus, retrovirus, plásmidos o bacteriófagos, no siendo esta lista limitante. Cualquier célula de mamífero puede usarse como célula huésped, es decir, como una célula que expresa el gen que codifica la clusterina, por ejemplo, CHO, CHO dhfr- (por ejemplo, CHO DX BII, CHO DG44), CHO Lec13, YB2/0, SP2/0, NSO, 293, BHK, Jurkat, Vero o COS.

La clusterina sintética puede obtenerse mediante cualquier método conocido de diseño de novo de proteínas distinto del utilizado para la preparación de proteína recombinante, como por ejemplo mediante ensamblaje en una matriz.

Cualquiera que sea el modo de preparación de la clusterina, las secuencias de clusterina de muchas especies son conocidas y pueden usarse en el contexto de la invención. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la clusterina puede ser la de la secuencia SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO:1 Clusterin_homo sapiens

MMKTLFFFVVG	LLLTWESGQV	LGDQTVSDNE	LQEMSNQGSK
YVNKEIQNAV	NGVKQIKTLI	EKTNEERKTL	LSNLEEAKKK
KEDALNETRE	SETKLKELPG	VCNETMMALW	EECKPCLKQT
CMKFYARVCR	SGSGLVGRQL	EEFLNQSSPF	YFWMNGDRID
SLLENDRQQT	HMLDVMQDHF	SRASSIDEL	FQDRFFFTREP
QDTYHYLPFS	LPHRRPHFFF	PKSRIVRSLM	PFSPYEPLNF
HAMFQPFLEM	IHEAQQAMDI	HFHSPAFQHP	PTEFIREGDD
DRTVCREIRH	NSTGCLRMKD	QCDKCREILS	VDCSTNNPSQ
AKLRRELDES	LQVAERLTRK	YNELLKSYQW	KMLNTSSLLE
QLNEQFNWVS	RLANLTQGED	QYYLRVTTVA	SHTSDSDVPS
GVTEVVVKLF	DSDPITVTVP	VEVSRKNPKF	METVAEKALQ
EYRKKHREE			

5 La clusterina utilizada puede ser una variante que tenga al menos un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, por ejemplo 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. La secuencia de identidad puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante un algoritmo de
 10 alineación de secuencias como BLAST P. En particular, una variante de clusterina puede ser una variante cuya función se conserva. Como tal, puede ser clusterina en la que un residuo de aminoácido dado en clusterina natural se modifica en la variante sin alterar ni la conformación ni la función general de clusterina, incluyendo, pero sin limitar, el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido que tenga propiedades similares, como por ejemplo la polaridad, el potencial de enlace al hidrógeno, la hidrofobicidad, la acidez, la basicidad, la aromaticidad, etc. Por consiguiente, una variante también se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 70% de identidad de aminoácidos y que tiene las mismas propiedades o funciones idénticas o sustancialmente similares a la proteína nativa o parental con la que se compara.

15 Sin desear estar vinculado por un mecanismo de acción, parece que la acción de la clusterina está vinculada a la función chaperona de las histonas de la misma.

20 Como se usa en este documento, el término "histona" tiene su significado general. Las histonas son proteínas básicas pequeñas con alto contenido de lisina o arginina y que actúan en el empaquetado del ADN. Las histonas están muy conservadas y se pueden agrupar en cinco clases principales: H1/H5, H2A, H2B, H3 y H4 organizadas en dos superclases de histonas de núcleo (H2A, H2B, H3 y H4) e histonas de unión (H1 y H5). Para los fines de la invención, una proteína histona puede ser una histona de longitud completa, un fragmento o una variante de la misma. Una variante de histona se puede modificar, por ejemplo, eliminando, añadiendo y/o sustituyendo aminoácidos. Alternativamente, una histona puede modificarse mediante acetilación y/o metilación de lisina y arginina. En general, las modificaciones no comprometen sustancialmente la naturaleza policatiónica de la histona o la capacidad de la histona para localizarse en un órgano.

25 Ventajosamente, la clusterina se une a las histonas para inhibir toda o parte de su acción inflamatoria y/o tóxica. Esta puede ser una inhibición de al menos el 20%, por ejemplo el 30%, o el 40%, o el 50%, o el 60%, o el 70%, o el 80%, o el 90%, o el 100%, de la inflamación y/o acción tóxica de las histonas.

30 Ventajosamente, la clusterina bloquea la producción de moléculas proinflamatorias, en particular citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α por monocitos humanos. Este puede ser el bloqueo de al menos el 20%, por ejemplo el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% de la producción de moléculas proinflamatorias.

35 Ventajosamente, la clusterina bloquea la inducción de la muerte de las células endoteliales, en particular neutralizando la capacidad de las histonas para inducir la muerte de las células endoteliales. Este puede ser el bloqueo de al menos el 20%, por ejemplo el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100%, de la inducción de la muerte de las células endoteliales.

40 En el contexto de la invención, pueden tener lugar todos o parte de los efectos mencionados anteriormente.

5 Las microangiopatías trombóticas pueden elegirse entre la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), el síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado o no a bacterias, el síndrome HELLP y formas secundarias de MAT, por ejemplo, las que se producen durante ciertos tratamientos, durante la quimioterapia, durante el cáncer o durante un trasplante alogénico de médula ósea.

10 Para los propósitos de la presente invención, el término "tratamiento" significa la administración de clusterina a un sujeto que exhibe uno o más síntomas de MAT, o diagnosticado de MAT sin mostrar síntomas de MAT, por ejemplo, diagnosticado en una etapa temprana de MAT. Ventajosamente, el tratamiento se puede administrar para tratar cualquier MAT, es decir, si se trata de un SHU, un PTT, un síndrome HELLP o un MAT secundario, sin que necesariamente se haya determinado con anterioridad el tipo de MAT. Esto tiene la ventaja de poder tratar a los pacientes sin esperar a haber definido el subtipo de MAT, y así evitar el agravamiento de la enfermedad y/o la aparición de síntomas. Alternativamente, el tratamiento se puede administrar después de la dosificación de clusterina, esta dosificación permite estratificar a los pacientes y posiblemente ofrecer el tratamiento solo a pacientes con niveles
15 bajos de clusterina, que es un marcador de la gravedad de la enfermedad.

20 Ventajosamente, el tratamiento puede ser una mejora o desaparición de uno o más síntomas de MAT, o una estabilización de todos o parte de los síntomas de MAT, o una ralentización de la progresión de todos o parte de los síntomas de MAT.

25 El tratamiento se puede lograr administrando una dosis terapéuticamente eficaz de clusterina, que es una dosis mínima para conferir un beneficio terapéutico a un paciente. Puede ser una dosis determinada por el médico en función de la patología, el estadio de la patología, la dosis inicial del nivel de clusterina del paciente y/o del paciente. Por ejemplo, la dosis diaria de clusterina puede estar entre 0,01 y 1000 mg por adulto por día. Esta puede ser, por ejemplo, una dosis diaria de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25, 0, 50,0, 100, 250 o 500 mg de clusterina. La dosis se puede adaptar según la etapa del tratamiento, por ejemplo aumentarse o disminuirse durante el tratamiento según las observaciones del médico.

30 El tratamiento puede administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, puede ser una administración oral o una administración parenteral de clusterina. En el caso de la administración parenteral, puede ser, por ejemplo, la administración intravenosa, la administración intramuscular o la administración subcutánea.

35 Ventajosamente, la clusterina se puede administrar como se describió anteriormente, en combinación con al menos otro principio activo o tratamiento conocido en el tratamiento de MAT. En el caso de la PTT, puede ser al menos un tratamiento elegido entre plasmaféresis, corticoesteroides, inmunosupresores, un anti-CD20 como por ejemplo Rituximab y un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor von Willebrand como Caplacizumab. En el caso del SUH típico, puede ser al menos un tratamiento elegido de tratamiento sintomático, plasmaféresis, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción C5 del complemento como por ejemplo Eculizumab y un anti-CD20 como, por ejemplo, Rituximab. En el caso del SUH atípico, puede ser al menos un tratamiento elegido de recambios plasmáticos y un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción C5 del complemento, como el Eculizumab. En el caso del síndrome HELLP, puede ser al menos un tratamiento elegido de la transfusión y la inducción del parto si la condición de la paciente empeora.

45 Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende clusterina para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas, no comprendiendo dicha composición la proteasa del factor von Willebrand, ADAMTS13.

50 En particular, la composición farmacéutica de la invención se puede usar en el tratamiento del síndrome SUH y HELLP.

La clusterina es como se describió anteriormente.

55 La composición farmacéutica puede comprender desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 1000 mg de clusterina, por ejemplo desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 100 mg. Una dosis eficaz de clusterina se proporciona en general a una dosis de aproximadamente 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, más en particular, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg de peso corporal por día.

60 Normalmente, la composición farmacéutica puede comprender, además de clusterina, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, al menos una matriz de liberación sostenida, tal como polímeros biodegradables.

65 "Farmacéutico" y "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades o composiciones moleculares cuya calidad cumple los requisitos de las normas vigentes. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación semisólida o líquida no tóxica de cualquier tipo

adecuado. En la composición farmacéutica de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, la clusterina, sola o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en forma de administración unitaria, opcionalmente en mezcla con vehículos farmacéuticos convencionales, para animales y seres humanos.

5 Las formas de administración unitaria adecuadas incluyen formas orales tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, administración intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial e intranasal y formas de administración rectal. Generalmente, la composición farmacéutica puede contener vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación inyectable. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (tales como fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, en particular liofilizadas, que, por adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las formas de dosificación adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de maní o un propilenglicol acuoso y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones, inyectables estériles. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y fluida para poder inyectarse con jeringa. Debe ser estable en condiciones convencionales de fabricación y almacenamiento y debe ser estable para evitar la contaminación por microorganismos, como bacterias y hongos. Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua de manera adecuada opcionalmente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en un medio de glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. La clusterina se puede formular en forma neutra o como sal.

25 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como los ácidos acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina y procaína. El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, etc.), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr añadiendo un agente antibacteriano y antifúngico, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico o timerosal. Opcionalmente, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado junto con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se pueden preparar incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes posibles, enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se puede tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se puede hacer primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas son particularmente adecuadas para las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

Otro objeto de la invención se refiere a un método ex vivo para estratificar a un paciente que padece MAT o que puede tenerlo, que comprende los siguientes pasos:

1) Medición, en una muestra biológica de dicho paciente, del nivel L_c de clusterina, y

2) Comparación de la tasa de L_c medida en el paso 1) con una tasa de clúster de referencia L_{ref} mediante el cálculo de la puntuación $S1 = L_c/L_{ref}$,

en el cual:

- Si $S1 \leq 1$, se considera que es probable que el paciente se beneficie del tratamiento de MAT con clusterina,
- Si $S1 > 1$, no se considera probable que el paciente se beneficie del tratamiento de MAT con clusterina.

A los efectos de la presente invención, se entiende por “estratificación” la aproximación terapéutica donde el objetivo es seleccionar los pacientes a los que administrar el tratamiento según un marcador predictivo, en este caso clusterina, con el fin de para tratar solo la subpoblación para la cual es probable que el tratamiento proporcione un beneficio entre los diagnosticados de MAT.

Por lo tanto, el procedimiento de estratificación de la invención puede llevarse a cabo antes del tratamiento con clusterina en pacientes diagnosticados con MAT, con el fin de apuntar a una población con mayor probabilidad de recibir un beneficio del tratamiento. De hecho, los inventores han demostrado que los pacientes que tienen niveles bajos de clusterina durante el diagnóstico de MAT, en particular menores o iguales a 200 µg/ml, también tienen niveles más bajos de plaquetas y niveles más altos de LDH, que son dos marcadores de la gravedad, en menos hematológico, de la enfermedad.

A los efectos de la presente invención, se entiende por “muestra biológica” cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto, en particular ya diagnosticado o en proceso de diagnóstico de MAT. Es probable que la muestra contenga clusterina. La muestra puede ser, por ejemplo, un fluido corporal, que puede contener o no células, por ejemplo sangre, ya sea suero y/o plasma, orina, saliva o una biopsia. También puede ser una sección de tejido, como secciones congeladas, tomadas con fines histológicos. La expresión “muestra biológica” también abarca cualquier material derivado de una muestra biológica, por ejemplo, células (o su progenie) aisladas de la muestra, o proteínas extraídas de la muestra. El tratamiento de una muestra biológica puede implicar una o más etapas seleccionadas de filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes o adición de reactivos. Cuando la muestra biológica es una muestra de sangre, puede ser sangre completa, suero o plasma.

La etapa de medir, en la muestra biológica del paciente, el nivel de L_c de clusterina, puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. La clusterina medida puede ser clusterina libre o clusterina complejada. Este paso puede comprender, por ejemplo, poner la muestra en contacto con uno o más compañeros de unión capaces de interactuar selectivamente con la clusterina contenida en la muestra biológica. Un compañero de unión puede ser un anticuerpo, como anticuerpos monoclonales o aptámeros. Los soportes sólidos que se pueden utilizar en la realización de esta etapa pueden ser, por ejemplo, sustratos como la nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o microtitulación), cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o microtitulación de pocillos), látex de poliestireno (por ejemplo, microesferas o placas de microtitulación), fluoruro de polivinilidina, papel diazotizado, membranas de nailon, microesferas activadas o microesferas magnéticamente reactivas, esta lista no es exhaustiva. La clusterina puede entonces revelarse con un segundo compañero de unión, como un anticuerpo o aptámero específico para la clusterina. Normalmente, la segunda pareja de unión es un anticuerpo específico conjugado con una enzima. El nivel de clusterina se puede medir usando técnicas de inmunodiagnóstico estándar, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, de reacción directa o de tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a ensayos de aglutinación, inmunoensayos mediados por enzimas, tales como ELISA, ensayos de biotina/avidina, radioinmunoensayos, inmunolectroforesis o inmunoprecipitación. Puede ser, por ejemplo, la prueba de ensayo del kit ELISA de clusterina humana, Thermo Scientific™ Pierce™ comercializado por Invitrogen o una prueba de ELISA Quantikine® - R&D Systems, específica para análisis en suero y plasma humanos.

El valor de referencia predeterminado L_{ref} puede ser relativo a un valor derivado de estudios de población, incluidos, sin limitación, sujetos del mismo grupo de edad o de un grupo de edad similar, sujetos que pertenecen al mismo grupo étnico o un grupo étnico similar, y sujetos con el mismo grado de gravedad de la enfermedad. Dichos puntos de referencia predeterminados pueden derivarse de análisis estadísticos y/o datos de predicción de riesgo poblacional obtenidos de algoritmos matemáticos e índices de enfermedad calculados. Por ejemplo, la línea de base predeterminada puede derivarse del nivel de clusterina en una muestra de control de uno o más sujetos sin MAT. Alternativamente, la medición retrospectiva del nivel de clusterina de muestras de sujetos históricamente clasificados correctamente puede usarse para establecer la línea de base predeterminada.

A los efectos de la presente invención, la expresión “beneficio de un tratamiento de MAT” significa una mejora o desaparición de uno o más síntomas de MAT, o una estabilización de todos o parte de los síntomas de MAT, o una progresión más lenta de algunos o todos los síntomas de MAT.

Por ejemplo, para la determinación del valor de referencia, el nivel de clusterina se puede medir en 100 muestras biológicas de 100 sujetos. Después de separar los dos primeros subconjuntos, se hacen las curvas de Kaplan Meier para cada uno de los dos subconjuntos y se puede calcular el valor p entre los dos subconjuntos. A continuación, se selecciona el valor de referencia de tal manera que la discriminación basada en el criterio del valor p mínimo sea la más fuerte. En otras palabras, el nivel de clusterina correspondiente al límite entre los dos subconjuntos para los que el valor p es mínimo se considera que es el valor de referencia predeterminado. Conviene observar que la línea de base predeterminada no es necesariamente el valor mediano del nivel de clusterina.

Por lo tanto, el valor de referencia predeterminado permite la discriminación entre un paciente que puede considerarse probable que reciba un beneficio del tratamiento de MAT con clusterina y un paciente que puede considerarse que no es probable que reciba un tratamiento beneficioso de MAT con clusterina.

A los expertos en la técnica también les pueden parecer otras ventajas al leer los ejemplos siguientes, ilustrados por las figuras adjuntas, dadas a modo de ilustración.

Breve descripción de las figuras

- 5
- La figura 1 muestra la unión de la clusterina a las histonas. Las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 (New England Biolabs, Ipswich, MA) o ADN genómico obtenido de células humanas se inmovilizaron en el fondo de placas ELISA (1 µg/ml) en tampón carbonato/bicarbonato. 10 mM, pH = 9,6. Después de la saturación, las placas se incubaron con 1 mg/ml de clusterina humana recombinante (R&D systems, Abingdon, Reino Unido) o albúmina de suero humano (HSA; Sigma, St. Louis, MO), acoplada a biotina. Se ha demostrado la unión de Clu o HSA a histonas con estreptavidina acoplada a peroxidasa. Los resultados se expresan en densidad óptica (media ± DE, n = 5). La molécula de HSA se utilizó como proteína de control. La unión del ADN genómico en las placas de ELISA se verificó con un anticuerpo anti-ADN acoplado a peroxidasa (datos no mostrados).
- 10
- La figura 2 muestra la cuantificación por ELISA de IL-6, en pg/ml, en los sobrenadantes de cultivo de monocitos humanos aislados de la sangre de donantes sanos mediante clasificación magnética y luego incubados durante 12 h con 12,5 µg/ml de histonas, en la presencia (diagrama 4) o en ausencia (diagrama 3) de 25 mg/ml de clusterina (CLU). El diagrama 1 es el control de cultivo para monocitos solos y el diagrama 2 es el control de cultivo para monocitos incubados con 25 µg/ml de clusterina.
- 15
- La figura 3 representa el porcentaje de células apoptóticas medido en el caso de células endoteliales humanas incubadas durante 15 min, es decir (1) gráfico de la izquierda: en presencia de sueros control (HNS) en presencia o ausencia de histonas (50 ng/ml) Histones de chez Roche), es decir (2) gráfico de la derecha: con sueros de pacientes que contienen histonas endógenas (SS; n = 5, 10% vol/vol) en presencia o ausencia de 200 ng/ml de Clu.
- 20
- La figura 4 representa la dosis de clusterina sérica, en µg/ml, en pacientes con MAT y en pacientes sanos. (A) La clusterina sérica se mide en pacientes sanos (cuadrados) y pacientes con MAT al inicio de la MAT (círculos llenos) o 3 meses después del diagnóstico (círculos abiertos). (B) La evolución de la clusterina sérica en pacientes con MAT en el momento del diagnóstico (puntos a la izquierda) y 3 meses después del diagnóstico (puntos a la derecha). Cada punto representa a un paciente. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas.
- 25
- La figura 5 representa (A) para pacientes con SUH típico, la dosis de clusterina sérica en µg/ml, al diagnóstico de MAT (izquierda) y después de 3 meses de tratamiento (derecha) con Eculizumab (SOLIRIS); (B) para pacientes con SUH típico, el nivel de nucleosomas circulantes (AU) en el momento del diagnóstico de MAT (izquierda) y después de 3 meses de tratamiento (derecha) con Eculizumab (SOLIRIS). Los pacientes con MAT mediada por ST (SUH típico) se trataron de forma homogénea con eculizumab (SOLIRIS) de acuerdo con el mismo régimen de tratamiento. (C) y (D) para pacientes con MAT mediada por complemento, el nivel de nucleosomas circulantes (AU) en el momento del diagnóstico de MAT (izquierda) y después de 3 meses de tratamiento (derecha) con Eculizumab (SOLIRIS); Los pacientes con MAT mediada por complemento han sido tratados de forma variable según el contexto clínico.
- 30
- La figura 6 representa la concentración de plaquetas, en g/l (gris oscuro), de clusterina sérica en µg/ml (gris claro) y de nucleosomas circulantes en AU (gris medio), en 7 pacientes con MAT, de la primera a la octava inyección de Eculizumab (tSUH, n = 7). La clusterina sérica, los nucleosomas circulantes y la concentración de plaquetas se midieron justo antes de cada inyección de Eculizumab. Eculizumab se inyectó repetidamente cada 2 semanas. La octava inyección se produjo un promedio de 2 meses desde el diagnóstico de SHUa.
- 35
- La figura 7 representa A: la concentración de LDH (UI/ml), B: la concentración de nucleosomas circulantes (UA), C: la concentración de plaquetas (g/l), D: la concentración de hemoglobina (g/dl), E: la concentración de ADAMTS13 (% de actividad) y F: el porcentaje de IECAE (unidad arbitraria que permite medir la actividad funcional de la vía terminal común del complemento mediante prueba ELISA, empresa Diasorin) según la concentración de clusterina sérica (mg/ml) en un paciente en el momento del diagnóstico de SUH (SUH mediado por toxina Shiga).
- 40
- La figura 8 representa (A): la dosis de clusterina sérica, en µg/ml, en pacientes con MAT mediada por la toxina shiga tSUH (n = 8), pacientes con MAT mediada por el complemento SUHa (n = 6) y sujetos sanos (n = 14); (B) el nivel de nucleosomas circulantes, en AU, en pacientes con MAT mediada por toxina shiga (n = 8), pacientes con MAT mediada por complemento (n = 6) y sujetos sanos (n = 14).
- 45
- 50
- 55

EJEMPLOS

- 60 Ejemplo 1: Clusterina neutraliza las acciones de las histonas al bloquear la producción de moléculas proinflamatorias

Se aislaron monocitos humanos de la sangre de donantes sanos mediante clasificación magnética (clasificación positiva sobre la base de la expresión del marcador CD14; Mylteny Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Los monocitos (2×10^6 células/ml) se incubaron durante 12 h con 12,5 µg/ml de histonas (Sigma), en presencia o ausencia

de 25 mg/ml de clusterina (CLU). La IL-6 se cuantificó mediante ELISA (Diacclone, Besançon, Francia) en los sobrenadantes del cultivo. Los resultados se expresan en pg/ml (media \pm DE, n = 6).

Los resultados se muestran en la Figura 2.

5

Ejemplo 2: La clusterina protege las células endoteliales de la muerte inducida por sueros que contienen histonas

Las células endoteliales humanas (HDMEC de Promocell) se incuban durante 15 min en presencia de sueros de control (HNS; ídem) en presencia o no de histonas (50 ng/ml de histonas de Roche), o con sueros de pacientes que contienen histonas endógenas. (SS; n = 5, 10% vol/vol) en presencia o ausencia de 200 ng/ml de Clu. Después de 15 min, las células endoteliales se marcan con anexina V y yoduro de propidio (Becton Dickinson Kit) para evaluar el porcentaje de células apoptóticas mediante citometría de flujo.

10

Los resultados se muestran en la Figura 3.

15

Ejemplo 3: El nivel de clusterina está asociado con la actividad de MAT

Los niveles de clusterina sérica son más bajos en pacientes con MAT (TMA) en el momento del diagnóstico que en sujetos sanos. El nivel de clusterina sérica se midió en 11/14 pacientes al tercer mes del diagnóstico de MAT, después del tratamiento. No difirió significativamente de la de la población de sujetos sanos, pero fue significativamente mayor que en el momento del diagnóstico. La clusterina se analizó mediante ELISA (R&D Systems) en sueros de sujetos sanos y pacientes con MAT.

20

Los resultados se muestran en la Figura 4.

25

Ejemplo 4: Se observa deficiencia de clusterina en diferentes tipos de MAT

En pacientes con SUH típico (20 casos) o atípico (10 casos), PTT (30 casos) y/o síndrome HELLP (50 casos), al diagnóstico y seguimiento. Estos ensayos se llevan a cabo mediante técnicas comerciales de ELISA.

30

Los resultados esperados permiten establecer asociaciones estadísticas y/o correlaciones con los principales criterios biológicos de seguimiento de los pacientes (nivel plaquetario, LDH, haptoglobina, marcadores de daño renal (creatinina sérica, cociente albuminuria/creatininuria, etc.) o marcadores de daño extrarrenal en su caso (troponina, ASAT/ALAT, gammaGT, etc.).

35

Ejemplo 5: la clusterina es un citoprotector endotelial en los síndromes MAT

Las células endoteliales microvasculares se incuban en presencia de sueros de pacientes afectados por síndrome de SUH, PTT o HELLP con o sin adición de clusterina recombinante (dosis objetivo 25 μ g/ml) durante 2 h, 6 h o 24 h. El análisis de muerte celular (apoptótica o necrótica) se realiza marcando en citometría de flujo (anexina-5, yoduro de propidio).

40

Se espera que las histonas y nucleosomas que circulan en el suero de pacientes que padecen MAT generen lesiones endoteliales, y que la adición de clusterina proteja a las células endoteliales de la muerte inducida por estos elementos tóxicos.

45

Ejemplo 6: La clusterina demuestra un efecto in vivo en un modelo típico de ratón SUH

Se realizan dos tipos de análisis.

50

1) Estudio de la toxicidad renal inducida por STX en ratones C57BL/6J invalidados por el gen de la clusterina (KO Clu) para demostrar un empeoramiento de la toxicidad renal y de los marcadores biológicos de SUH (trombocitopenia, anemia) en ausencia de clusterina. En una primera parte de los experimentos, se busca una dosis subletal para seguir con mayor precisión los marcadores del SUH como anemia, trombocitopenia e insuficiencia renal. Las dosis de 625 pg/g, 300 pg/g y 100 pg/g se prueban en animales salvajes (10 ratones por dosis, más 10 ratones de control). Los ratones se pesan diariamente, el peso se usa como indicador de toxicidad porque la pérdida de peso está correlacionada en el modelo de ratón con la enfermedad.

55

Una vez que se ha establecido la dosis, los ratones WT y los ratones clusterina-KO se inyectan intraperitonealmente con la dosis elegida de STX o con PBS y luego se les sigue una muestra de sangre en la que se toma un hemograma completo. La hemoglobina se analiza en paralelo para calcular un índice de anemia. El suero también se analiza en busca de marcadores de insuficiencia renal (creatinina y cistatina). Se extraen los riñones para analizar los depósitos de proteína C3, un marcador de daño renal.

60

2) Estudio del papel protector y terapéutico de la clusterina en MAT en un modelo de ratón de SUH en ratones C57BL/6J normales (no deficientes en clusterina)

5 Los ratones WT se inyectan intraperitonealmente con la dosis elegida de STX o con PBS. Los ratones se tratan mediante inyecciones regulares de clusterina murina recombinante (1 µg/kg). El seguimiento se realiza tomando una muestra de sangre sobre la que se realiza un hemograma completo. La hemoglobina se analiza en paralelo para calcular un índice de anemia. El suero también se analiza en busca de marcadores de insuficiencia renal (creatinina y cistatina). Se extraen los riñones para analizar los depósitos de proteína C3, un marcador de lesiones renales.

10 Se espera que:

- existe una correlación entre la ausencia de clusterina y el empeoramiento de la toxicidad renal y los marcadores biológicos del SUH (trombocitopenia, anemia)

15 - los resultados permiten demostrar el papel no redundante de la clusterina en el control de la toxicidad inducida por la toxina shiga en un modelo de ratón

- los resultados demuestran un papel protector y terapéutico de la clusterina en MAT en un modelo de SUH murino y demuestran una mejora en la función renal y en los parámetros de hemólisis y trombocitopenia en ratones suplementados en comparación con el grupo control.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> UNIVERSITE DE BORDEAUX CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BORDEAUX INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE UNIVERSITE D'ANGERS CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE D'ANGERS

30 <120> CLUSTERINA PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE MICROANGIOPATÍAS TROMBÓTICAS

<130> BNT222879PC00

<150> FR1756912

<151> 2017-07-21

35 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 1

ES 2 883 952 T3

Met Met Lys Thr Leu Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Leu Thr Trp Glu
 1 5 10 15

Ser Gly Gln Val Leu Gly Asp Gln Thr Val Ser Asp Asn Glu Leu Gln
 20 25 30

Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys Tyr Val Asn Lys Glu Ile Gln Asn
 35 40 45

Ala Val Asn Gly Val Lys Gln Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys Thr Asn
 50 55 60

Glu Glu Arg Lys Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys
 65 70 75 80

Lys Glu Asp Ala Leu Asn Glu Thr Arg Glu Ser Glu Thr Lys Leu Lys
 85 90 95

Glu Leu Pro Gly Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp Glu Glu
 100 105 110

Cys Lys Pro Cys Leu Lys Gln Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala Arg Val
 115 120 125

Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Arg Gln Leu Glu Glu Phe Leu
 130 135 140

ES 2 883 952 T3

Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg Ile Asp
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met Leu Asp Val Met
 165 170 175

Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp Glu Leu Phe Gln
 180 185 190

Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr His Tyr Leu Pro
 195 200 205

Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe Pro Lys Ser Arg
 210 215 220

Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu Pro Leu Asn Phe
 225 230 235 240

His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His Glu Ala Gln Gln
 245 250 255

Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln His Pro Pro Thr
 260 265 270

Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val Cys Arg Glu Ile
 275 280 285

Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg Ile Asp
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met Leu Asp Val Met
 165 170 175

Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp Glu Leu Phe Gln
 180 185 190

Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr His Tyr Leu Pro
 195 200 205

Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe Pro Lys Ser Arg
 210 215 220

Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu Pro Leu Asn Phe
 225 230 235 240

His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His Glu Ala Gln Gln
 245 250 255

Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln His Pro Pro Thr
 260 265 270

Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val Cys Arg Glu Ile
 275 280 285

REIVINDICACIONES

1. Clusterina para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas.
- 5 2. Clusterina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, siendo dicha clusterina una clusterina humana de secuencia SEQ ID NO: 1.
3. Clusterina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, teniendo dicha clusterina una secuencia peptídica que presenta al menos un 70%, preferiblemente al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 4. Clusterina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionándose dicha clusterina de una clusterina recombinante, una clusterina plasmática y una clusterina sintética.
- 15 5. Clusterina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las microangiopatías trombóticas se eligen de púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado o no a bacterias, síndrome de HELLP y una MTA secundaria.
- 20 6. Clusterina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tratamiento comprende la administración oral o parenteral de dicha clusterina.
- 25 7. Clusterina para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha administración parenteral se selecciona del grupo que comprende una administración intravenosa, una administración intramuscular y una administración subcutánea.
- 30 8. Composición farmacéutica que comprende clusterina para su uso en el tratamiento de microangiopatías trombóticas, no comprendiendo dicha composición proteasa del factor de von Willebrand.
9. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha clusterina es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 35 10. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, estando dicha composición farmacéutica en forma de solución inyectable.
- 40 11. Procedimiento de estratificación ex vivo de un paciente que padece MAT o que puede tenerla, que comprende los siguientes pasos:
 - 1) Medir, en una muestra biológica de dicho paciente, el nivel de clusterina, y
 - 2) Comparación de la tasa L_c medida en el paso 1) con una tasa de clusterina L_{ref} mediante el cálculo de la puntuación $S1 = L_c/L_{ref}$, en la que:
 - Si $S1 \leq 1$, se considera que es probable que el paciente reciba un beneficio del tratamiento de MAT por clusterina,
 - Si $S1 > 1$, no se considera probable que el paciente se beneficie del tratamiento de MAT con clusterina.

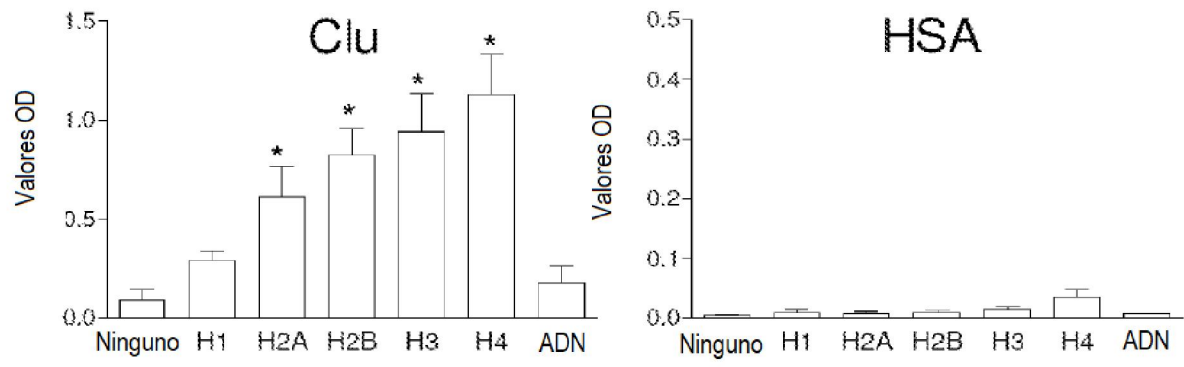


Figura 1

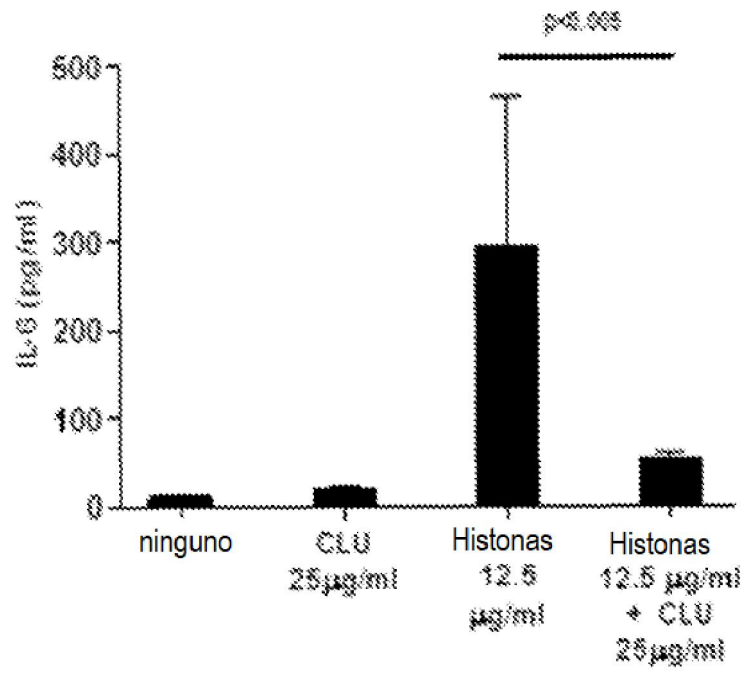


Figura 2

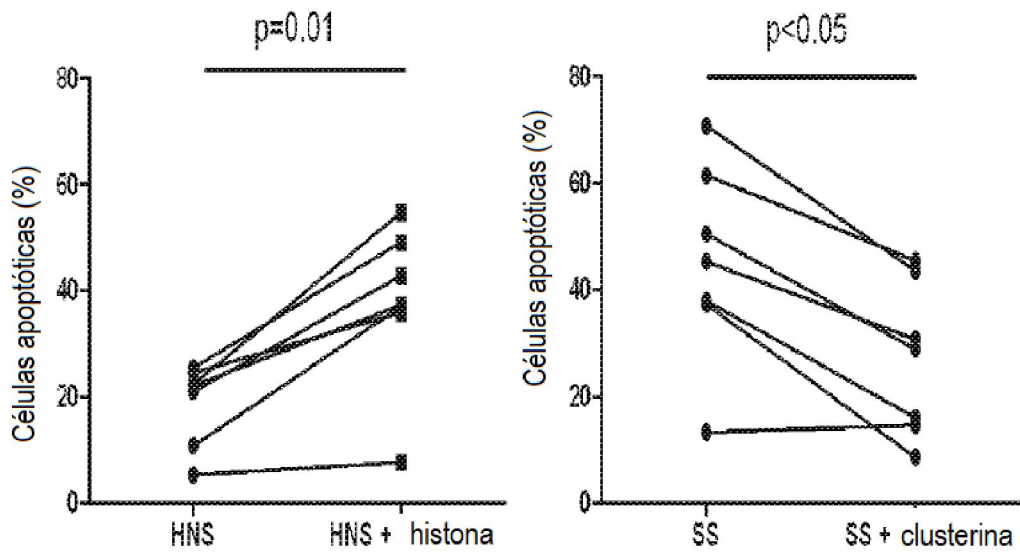


Figura 3

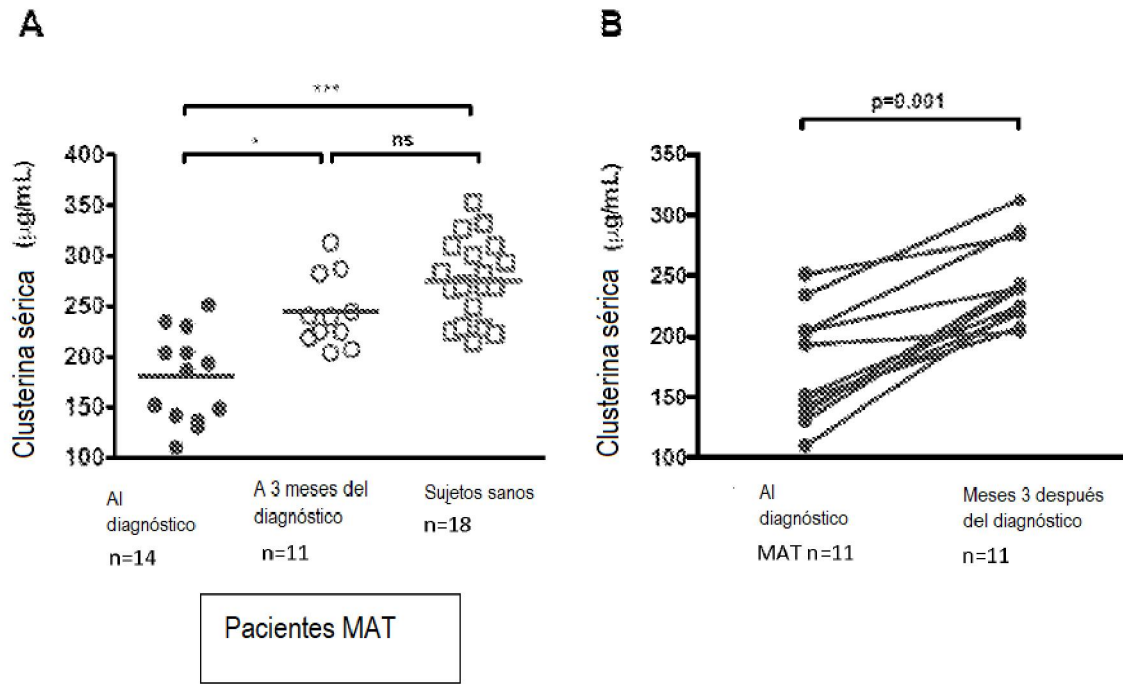


Figura 4

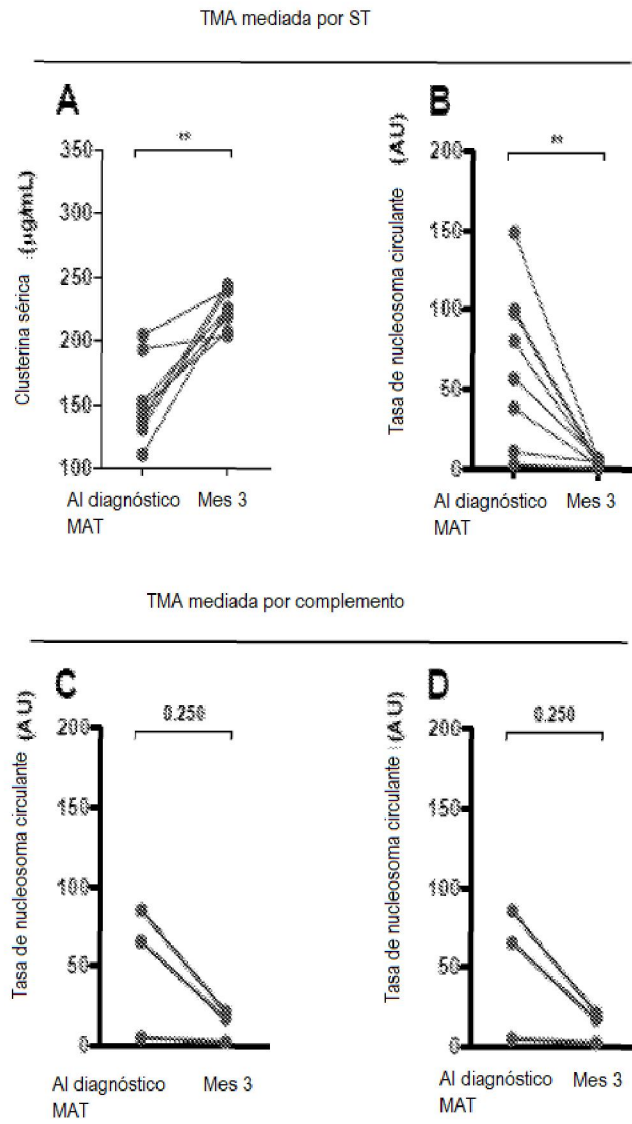


FIGURA 5

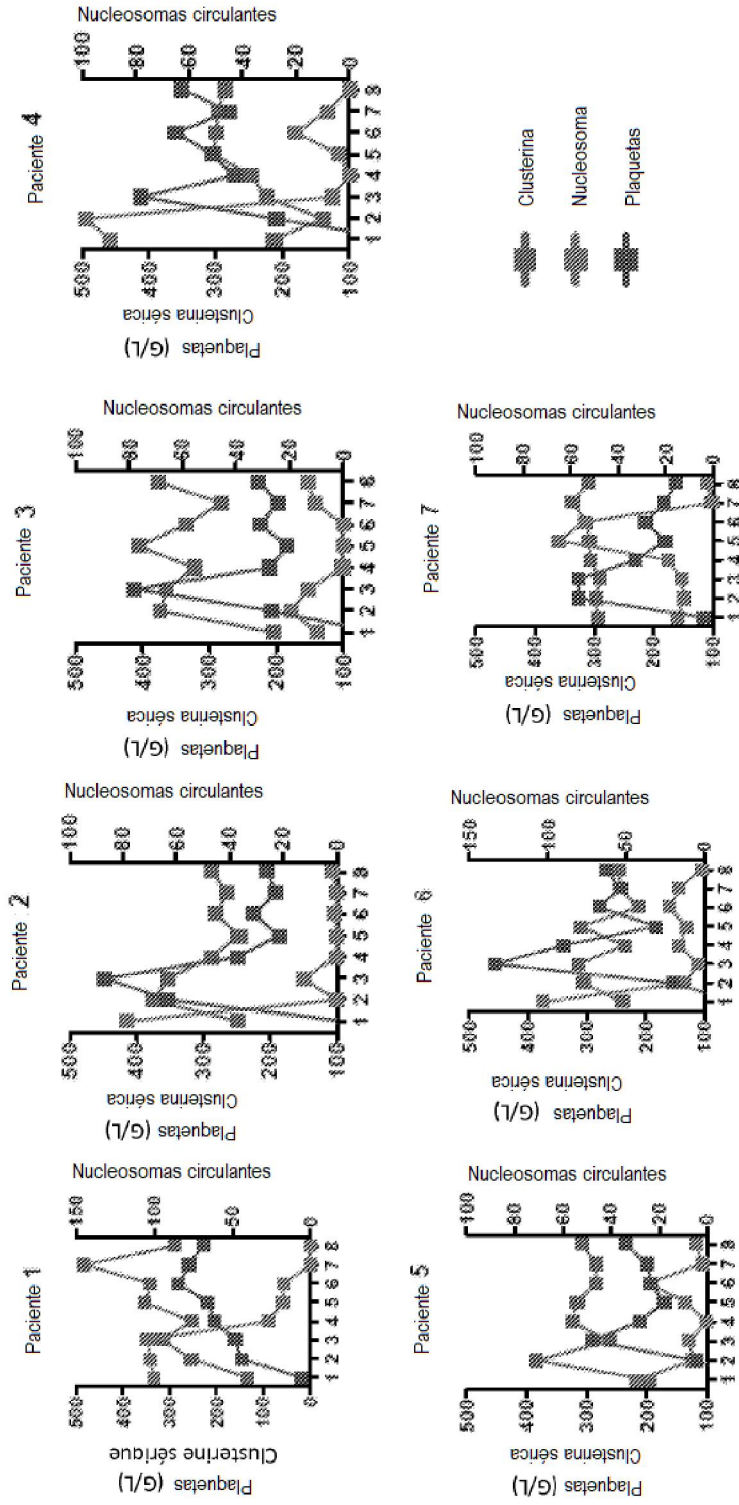


FIGURA 6

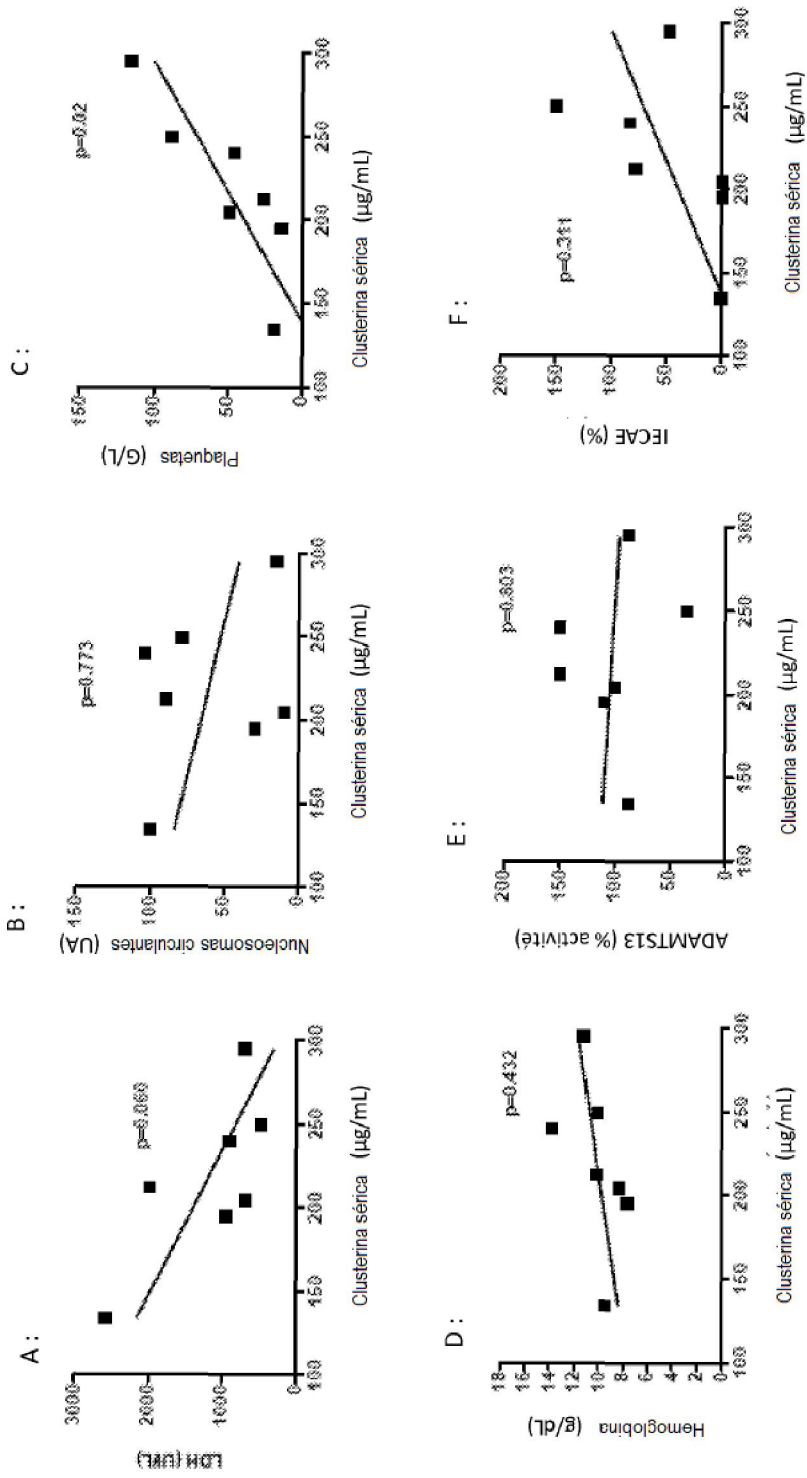


Figura 7

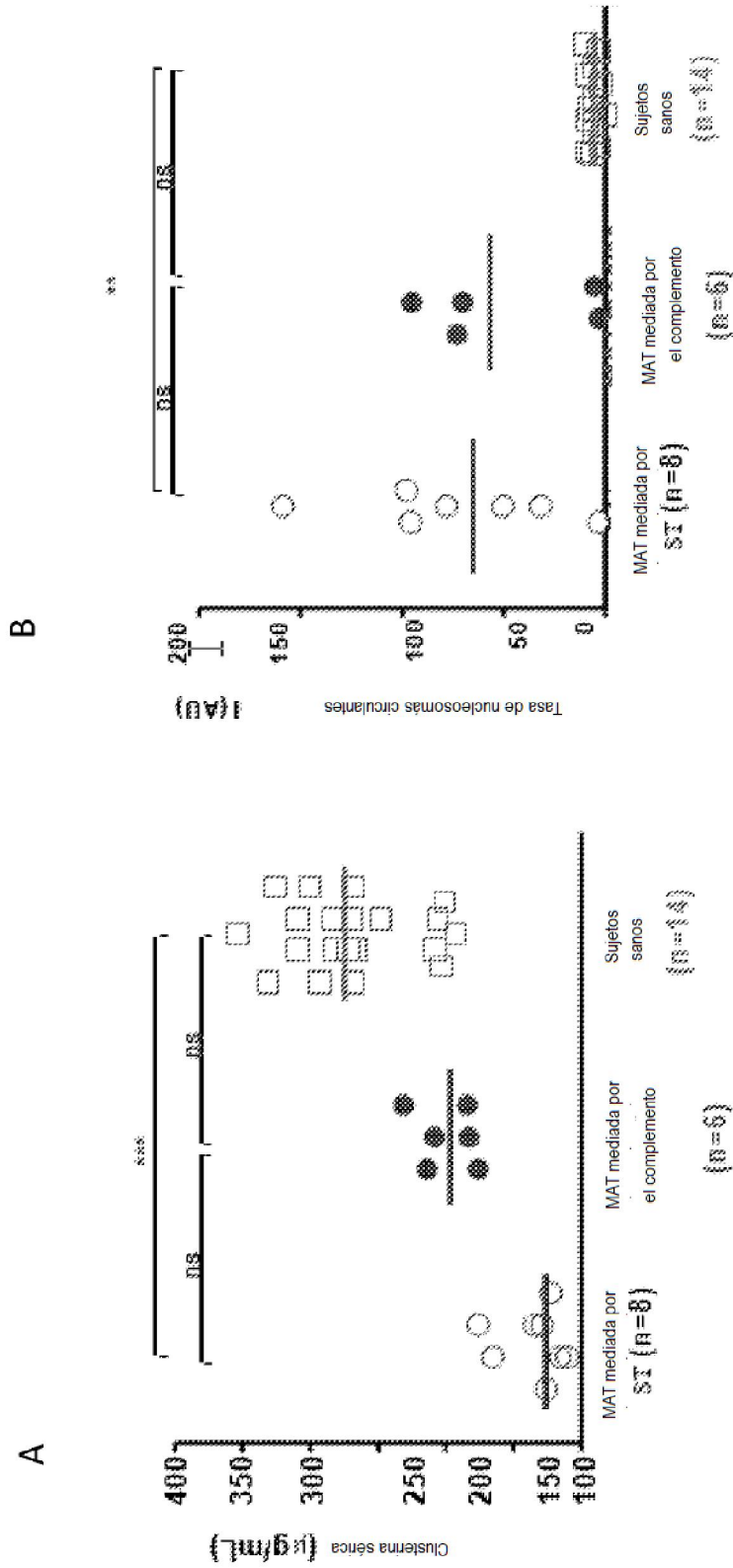


FIGURA 8