

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 978**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68	(2006.01)
A61K 38/46	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
C12N 9/64	(2006.01)
C12Q 1/37	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/576	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2017** E 21211497 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** EP 3988938

54 Título: **Medicina que comprende ADAMTS13 como ingrediente principal**

30 Prioridad:

08.01.2016 JP 2016002685

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

28.10.2024

73 Titular/es:

**KYOTO UNIVERSITY (50.0%)
36-1, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP y
KM BIOLOGICS CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HATA, KOICHIRO;
UEMOTO, SHINJI;
HIRAO, HIROFUMI y
KUBOTA, TOYONARI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 983 978 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

Medicina que comprende ADAMTS13 como ingrediente principal

5 Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la lesión por isquemia/reperfusión hepática. Específicamente, la invención se refiere a ADAMTS13 recombinante o un mutante del mismo para uso en el tratamiento y/o protección de lesión por isquemia-reperfusión hepática causada por isquemia-reperfusión que comprende isquemia por calor, como se establece en las reivindicaciones.

Técnica antecedente

15 El hígado es un órgano importante para controlar el metabolismo, la desintoxicación (desintoxicación de alcohol y sustancias tóxicas) y las defensas del cuerpo (inmunidad). La hepatitis aguda es una enfermedad que presenta disfunción hepática aguda causada principalmente por la infección del virus de la hepatitis y sus síntomas incluyen ictericia, anorexia, náuseas y vómitos, sensación de fatiga sistémica, fiebre y similares. Hasta el momento se han identificado cinco tipos de virus de la hepatitis, los tipos A, B, C, D y E. La hepatitis aguda es generalmente una enfermedad de curso benigno, pero se vuelve fulminante en aproximadamente el 1-2% de sus pacientes, y una vez que se torna fulminante, aumenta la posibilidad de una alta tasa de muerte y se hace necesaria la terapia de trasplante de hígado.

25 El síntoma prodrómico de la hepatitis aguda es el llamado síntoma similar al resfriado común (fiebre, dolor faríngeo y dolor de cabeza) y, en una etapa más temprana de la enfermedad, a menudo se diagnostica como un resfriado común y a menudo se prescribe un fármaco para el resfriado común. El diagnóstico de hepatitis aguda en esta etapa es difícil. Un síntoma específico que muestra la aparición de disfunción hepática es la ictericia y, por lo general, se observa orina marrón varios días antes de que aparezca el color amarillento del globo ocular y la piel amarillenta. La orina marrón tiene el color de la orina como el té Oolong y su color se vuelve negro hasta el color de la Coca-Cola con el progreso de la ictericia. Casi al mismo tiempo que aparece la ictericia, aparecen síntomas como anorexia, sensación de fatiga sistémica, náuseas y vómitos.

35 El diagnóstico de hepatitis aguda se realiza, además de los síntomas subjetivos mencionados anteriormente, mediante hallazgos de examen tales como un marcado aumento de las enzimas hepatocelulares, ALT (GPT) y AST (GOT), y un aumento del valor de bilirrubina que sirve como índice de ictericia. El aumento de estos valores numéricos indica que se ha producido un daño amplio en los hepatocitos. El diagnóstico de los virus causantes se realiza mediante análisis de sangre específicos de los virus respectivos para identificar los virus causantes. Es decir, anticuerpo IgM positivo para HA para el tipo A; anticuerpo IgM positivo para HbC y antígeno positivo para HBs para el tipo B; ARN positivo para el VHC y anticuerpo positivo para el VHC para el tipo C; anticuerpo IgM negativo para HA, anticuerpo IgM negativo para HbC, RNA negativo para el VHC, anticuerpo antinuclear negativo (negación de hepatitis autoinmune) y negación de una infección viral conocida para el tipo no ABC.

45 Para el diagnóstico de gravedad, la gravedad del daño hepático se indica mediante una prueba de coagulación de la sangre, tal como la etapa de protrombina y la etapa de hepaplastina, que reflejan de forma aguda la capacidad de reserva hepática, mediante un análisis de sangre. Aunque la hepatitis aguda normal no muestra un trastorno consciente, cuando la hepatitis aguda es fulminante y se produce un daño generalizado de los hepatocitos, la función de desintoxicación del hígado se deteriora porque la capacidad de reserva hepática disminuye notablemente. Varias sustancias tóxicas no se metabolizan y eliminan en el hígado y permanecen en el cuerpo para causar un trastorno de la función cerebral que presenta síntomas tales como reversión diurna, delirio, somnolencia, coma y similares. Un trastorno consciente causado por una disminución de la capacidad de reserva hepática se denomina coma hepático. Según la extensión de la etapa de protrombina y un trastorno consciente, la hepatitis aguda se clasifica en tres niveles de gravedad, es decir, un tipo normal, hepatitis grave y hepatitis fulminante. Una vez que la hepatitis aguda es fulminante, aumenta la posibilidad de una alta tasa de muerte y se hace necesaria la terapia de trasplante de hígado.

55 La hepatitis aguda tiene un curso y una gravedad diferentes dependiendo del tipo de virus causante. La hepatitis A y la hepatitis E son transitorias y no crónicas. La hepatitis B es muy crónica cuando se infecta en las etapas neonatal y pediátrica, pero en principio es transitoria y rara vez crónica cuando se infecta en la edad adulta. La hepatitis C es muy crónica independientemente de la edad de la infección. La probabilidad de que la hepatitis aguda se vuelva grave y fulminante y conduzca a la muerte es del 1-2% para la hepatitis B y no ABC y del 0,5% o menos para la hepatitis C y A. Para la hepatitis A, la tasa de mortalidad en sí es baja pero, debido a su infección oral, la infección secundaria ocurre en una familia para causar una epidemia explosiva. Recientemente, la infección en una persona de 50 años o más está aumentando y se vuelve grave, por lo que se debe tener cuidado.

65 La hepatitis aguda, a excepción de la hepatitis C, es una enfermedad que es transitoria y se cura fácilmente de forma natural. El punto de observación más importante para el tratamiento de la hepatitis aguda es la determinación de si ha pasado o no un período extremo. Cuando se sospecha que la hepatitis aguda se vuelve grave o fulminante, es necesario un tratamiento inmediato por parte de un especialista. El pronóstico de vida de la hepatitis aguda es muy

bueno a menos que se vuelva grave y fulminante. Para la hepatitis A y B, se puede establecer una inmunidad de por vida y no se produciría una reinfección. En el caso de la hepatitis C, después del transcurso de la fase aguda, se requiere tratamiento con interferón para el tratamiento de la enfermedad que es prolongada y crónica.

5 Como terapia farmacológica, no existe una necesidad particular de la administración de un fármaco en la mayoría de los casos, pero en la fase aguda la transfusión se lleva a cabo porque a menudo se quejan de anorexia y sensación de fatiga sistémica. Los corticosteroides son un tipo de agentes antiinflamatorios e inmunosupresores potentes. El corticosteroide suprime la respuesta inmune como mecanismo de exclusión del virus de la hepatitis y posiblemente prolonga la hepatitis y, por lo tanto, no se administra en la hepatitis aguda normal. Sin embargo, en el caso de que la hepatitis aguda se vuelva posiblemente grave y fulminante, se puede esperar un efecto terapéutico administrando el medicamento en una etapa muy temprana y suprimiendo la respuesta inmune. Además, en el caso de que se mantenga un alto grado de ictericia, los corticosteroides pueden ser eficaces. Sin embargo, en vista de los efectos secundarios, no debe usarse fácilmente y una vez iniciada la administración, la administración debe realizarse en el menor período de tiempo posible.

15 En el caso de que la hepatitis B aguda se vuelva grave y prolongada, se administra un agente antiviral, tal como lamivudina y entecavir. La determinación de la administración y la interrupción de la administración del agente antiviral la realiza un especialista. En el curso natural de la hepatitis C aguda, alrededor del 50-90% de los casos se prolongan y se vuelven crónicos. Para la prevención de la cronicidad de la hepatitis C aguda, se administra interferón (IFN) durante 2-6 meses. Las precauciones en el caso de la administración de IFN son las mismas que las de la hepatitis crónica y el tratamiento se realiza bajo el control de un especialista ante los diversos efectos secundarios.

25 En el hígado, la sangre que fluye a través de la vena porta y la arteria se mezcla en el sinusoides en forma de red, correspondiente al capilar de la circulación corporal, y fluye hacia la vena hepática. En el hígado, la terminal de la vena porta (rama terminal de la vena porta) y la terminal de la arteria hepática forman la sinusoides, que fluye hacia la vena central (vena terminal del hígado). Al igual que en el sistema capilar de la circulación corporal, el sinusoides participa en el intercambio de diversas sustancias (nutrientes, amoníaco, etc.) como sistema de microcirculación hepática.

30 La microangiopatía trombótica (MAT) es una de las enfermedades que amenazan la vida y se caracteriza por la coagulación plaquetaria en todo el cuerpo y, por tanto, insuficiencia multiorgánica. Un síndrome famoso que pertenece a la categoría de MAT incluye la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) acompañada de los cinco síntomas (reducción de plaquetas, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, disfunción renal, trastorno psiconeurótico) y síndrome urémico hemolítico (SUH) acompañado de los tres síntomas (reducción de plaquetas, anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda), como informó por primera vez Moschcowitz en 1924. Dado que hay muchos casos en los que estos síntomas típicos no se manifiestan y estas dos enfermedades son difíciles de distinguir entre sí, a menudo se las denomina PTT/SUH o en conjunto como MAT.

40 La MAT se desarrolla con mayor frecuencia después de la enteritis por *E. coli* enterohemorrágica, tal como 0157 o 0111, pero también es causada por un fármaco, trasplante de médula ósea y trasplante de hígado. La anomalía de ADAMTS13 se considera otra causa de MAT. ADAMTS13 es una enzima de escisión de proteínas que pertenece a un grupo de metaloproteasas y escinde solo el FvW, que se relaciona con la hemostasia. El FvW se produce originalmente como una gran masa de MFvW IG (multímero del FvW inusualmente grande) en células endoteliales vasculares, que luego es escindido finamente por ADAMTS13 para obtener el FvW en un tamaño apropiado para exhibir así un efecto hemostático apropiado. Sin embargo, si la función de ADAMTS13 es extremadamente reducida, el FvW en un tamaño inapropiadamente grande permanece para ejercer un efecto hemostático excesivo, lo que lleva a la generación de trombos plaquetarios en el vaso sanguíneo. Como es más probable que el trombo por el FvW se genere con vasos sanguíneos más delgados, se considera que se genera un trombo plaquetario en los microvasos para desarrollar MAT.

50 Se sabe que la MAT provocada por la disminución de la actividad de ADAMTS13 se caracteriza por que (1) la disfunción renal es relativamente leve y que conduce a una púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) acompañada de (2) fiebre severa y (3) trastorno psiconeurótico severo. Estos síntomas, junto con (4) reducción de plaquetas y (5) anemia hemolítica, se denominan cinco síntomas. Sin embargo, se informa que todos estos síntomas se observan juntos solo en aproximadamente el 30% de los casos.

55 Las causas para reducir en gran medida la actividad de ADAMTS13 incluyen anomalías génicas congénitas y factores adquiridos. Una enfermedad que desarrolla MAT debido a una anomalía genética congénita de ADAMTS13 se denomina síndrome de Upshaw-Schulman. Esta es una enfermedad rara acompañada de ictericia severa y reducción de plaquetas desde la etapa de recién nacido. Para la causa de la reducción adquirida de la actividad de ADAMTS13, el más importante es un autoanticuerpo (tipo IgG) contra ADAMTS13. La enfermedad de causa desconocida es idiopática y la enfermedad desarrollada por otras enfermedades es secundaria. La enfermedad se desarrolla ampliamente desde un bebé hasta una persona mayor. Se dice que la proporción de hombre a mujer es de 1:2, un poco dominante en las mujeres. Se informa que la morbilidad es de aproximadamente 4 por millón, pero debido a la mejora de la tecnología de diagnóstico en los últimos años se supone una mayor morbilidad.

65 Aunque la medición de la actividad de ADAMTS13 es útil para evaluar el progreso de la enfermedad de MAT, debe

tenerse en cuenta que la MAT no puede excluirse mediante esta prueba sola ya que a menudo no se observa disminución en la actividad de ADAMTS13. El nombre de púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) está registrado como asignatura en el campo de la investigación clínica y el estudio en el proyecto estatal para superar enfermedades refractarias.

5 La terapia estándar para la MAT típica es el intercambio de plasma (IP) en una etapa temprana, y la tasa de curación en Japón es ahora de hasta el 90%. Sin embargo, la mortalidad por MAT después de un trasplante de hígado sigue siendo muy alta.

10 Se considera que el mecanismo de PTT es que un multímero de FvW de peso molecular ultra grande (MFVW IG) producido a partir de células endoteliales no se escinde cuando la actividad de ADAMTS13 se reduce para conducir a una agregación plaquetaria excesiva y formación de trombos en una porción en la que se produce un esfuerzo de cizallamiento alto, como en los vasos sanguíneos pequeños (Blood, 2008; 112: 11-18 (referencia 1 que no es de patente)).

15 El problema en el tratamiento de PTT incluye (1) aunque el diagnóstico de PTT/SUH es relativamente fácil en el diagnóstico clínico y se puede excluir el SUH (especificidad del 90%) si se observa una deficiencia grave (< 5%) de ADAMTS13, la sensibilidad de la prueba es indistinto; (2) para algunas causas de PTT/SUH, el recambio plasmático no es eficaz (J Clin Apher 2012; 27: 112-116 (referencia 2 que no es de patente)); y (3) la tasa de recurrencia de la PTT adquirida todavía es tan alta como del 20-50%.

20 Se establece la utilidad del recambio de plasma en la PTT idiopática. La PTT es problemática en su tasa de recurrencia. En los últimos años, se ha sugerido la posibilidad de que la tasa de recurrencia se pueda reducir mediante el uso de rituximab (Br J Haematol 2012; 158: 323-335 (referencia 3 que no es de patente)). Por otro lado, para la PTT causada después de un trasplante de células madre de médula ósea o PTT asociada a un tumor maligno, no tiene utilidad el recambio plasmático (tratamiento de la enfermedad primaria).

25 La lesión por reperfusión isquémica es causada por la producción de diversas sustancias tóxicas en la microcirculación en los órganos o tejidos en los que los órganos o tejidos están en un estado isquémico y se produce la reperfusión sanguínea. La teoría de la isquemia/reperfusión informada por McCord es la primera (McCord, N Engl J Med 1985; 312: 159 (referencia 4 que no es de patente)). El grado de lesión puede variar dependiendo de la duración y el grado de isquemia, el tipo de órgano y similares. En ocasiones, la lesión es grave en el caso de isquemia incompleta. Se cree que la reperfusión provoca una lesión de las células endoteliales vasculares y una lesión de la microcirculación que conduce al daño de los órganos. Un mecanismo para causar daño incluye el daño causado por la producción de radicales libres como el oxígeno activo tal como el superóxido (O₂⁻) y el radical hidroxilo (HO •) y el monóxido de nitrógeno (NO), daño causado por la producción de varios mediadores químicos tal como varias citocinas, endotelina y ácido araquidónico, y daño causado por la interacción entre neutrófilos activados y células endoteliales vasculares. La lesión es causada no solo localmente sino también secundariamente en los órganos principales de todo el cuerpo (daño de órganos remotos). En particular, se ataca el cerebro, pulmón, hígado, riñón y similares, lo que da como resultado un fallo multiorgánico. A menudo se observa después de la terapia de reperfusión hasta el infarto de miocardio, infarto cerebral, oclusión vascular de la membrana inter-intestinal y similares o después del trasplante de órganos. Ko (2015), World J Hepatol; 7(13) analiza la relevancia de ADAMTS13 para el trasplante y la cirugía de hígado y en el contexto de la lesión por isquemia-reperfusión.

35 La insuficiencia hepática es un grupo de enfermedades que presentan ictericia, ascitis, encefalopatía hepática, tendencia al sangrado y similares debido a la disminución del número y la función disminuida de los hepatocitos y se clasifica en insuficiencia hepática aguda y crónica según su curso. La insuficiencia hepática aguda se limita normalmente a la enfermedad en la que se producen necrosis e inflamación en el hígado normal y la insuficiencia hepática se produce en un plazo de seis meses. Su enfermedad típica es la hepatitis fulminante que se caracteriza por una necrosis hepática masiva o casi masiva desde el punto de vista histopatológico, presenta síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) con falla orgánica múltiple (FOM) intercurrente y a menudo resulta en mal pronóstico.

40 Con el hígado en estado de insuficiencia hepática en el que no existe probabilidad de recuperación de la función por ningún tratamiento médico debido a diversas enfermedades, las funciones básicas del cuerpo no pueden mantenerse a menos que se reemplacen con el hígado sano proporcionado, se realice trasplante de hígado. Una enfermedad de adaptación del trasplante de hígado incluye, en un adulto, cirrosis hepática (cirrosis tipo B, cirrosis tipo C, cirrosis hepática alcohólica, cirrosis autoinmune, cirrosis hepática no de tipo B ni de tipo C), enfermedades colestásicas (cirrosis biliar primaria (CBP), colangitis esclerosante primaria (CEP), enfermedad de Byler, enfermedad de Caroli, atresia biliar (AB), hepatitis fulminante, enfermedades metabólicas (hemocromatosis, etc.), tumor hepático (cáncer de hígado (primario, metastásico), tumor benigno) y similares.

45 Por otra parte, en un lactante, una enfermedad de adaptación del trasplante de hígado incluye enfermedades colestásicas (atresia biliar, síndrome de Alagille, enfermedad de Byler, dilatación quística del conducto biliar común, enfermedad de Caroli, etc.), cirrosis hepática (hepatitis autoinmune, etc.), enfermedades metabólicas (deficiencia de antitripsina α -1, etc.), hepatitis neonatal, hepatitis fulminante, tumor hepático (hepatoblastoma, carcinoma

hepatocelular, etc.) y similares.

Para el trasplante de hígado, el hígado a trasplantar tomado de un donante, después de disponerlo fuera del cuerpo en forma de trasplante, se almacena en una solución frigorífica hasta su implantación.

5 ADAMTS13 (tipo desintegrina y metaloproteína con 13 motivos de trombospondina tipo 1), que es una enzima de escisión específica de un factor hemostático von Willebrand (FvW), se encontró en el puesto 13 como metaloproteasa de tipo zinc perteneciente a la familia de ADAMTS en 2001.

10 El FvW tiene una estructura en la que las subunidades individuales que constan de 2050 residuos de aminoácidos están unidas mediante un enlace disulfuro en una forma de extremo terminal N a extremo terminal N o de extremo terminal C a extremo terminal C, tiene una estructura única de alto peso molecular y producido como multímero de FvW inusualmente grande (MFVW IG). ADAMTS13 escinde específicamente Ty842-Met843 (Tyr1605-Met1606 como indicación de ADNc) uniendo subunidades de FvW para reducir el tamaño de peso molecular de FvW para así prevenir un exceso de agregación plaquetaria causado por MFVW IG, permitiendo el ajuste de "ser adecuado para la formación de trombo hemostático pero evitando la formación patológica de trombos".

15 ADAMTS13 se identificó por primera vez como una enzima clave que causa una enfermedad sanguínea refractaria, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Sin embargo, se aclara que la "lesión microcirculatoria por trombosis plaquetaria" causada por la falla de equilibrio entre ADAMTS13/FvW (enzima/sustrato), que se encontró en el esclarecimiento de las condiciones patológicas de la enfermedad, constituye la patología básica de varias enfermedades.

20 El gen de ADAMTS13 está en el cromosoma 9q34. Su ADNc consta de 29 exones, que constan de 4281 pb desde el codón de iniciación al codón de terminación. ADAMTS13 es una proteína grande que consta de 1427 residuos de aminoácidos. ADAMTS13 contiene 10 cadenas de azúcar que se unen a Asn en la molécula y tiene un peso molecular total de 190 kD. Su estructura primaria, a partir del extremo terminal N, consta de péptido señal (S), propéptido (P), dominio de metaloproteasa de tipo repolisina (MP), dominio de tipo desintegrina (D), motivo de trombospondina de tipo 1 (Tsp1) (T1-8), dominio rico en cisteína (C), dominio espaciador (Sp), nuevamente repetición del motivo Tsp1 y dos dominios CUB en el extremo terminal C. Se considera que la cadena de azúcar de la enzima que se une a Asn es importante en la función secretora de la célula. El hígado se identificó por primera vez como el órgano que produce ADAMTS13 y se identificaron las células estrelladas hepáticas (anteriormente células Itoh) como las células que producen ADAMTS13. Se indica que las células estrelladas hepáticas están estrechamente relacionadas con el progreso de la cirrosis hepática a través de la transformación en fibroblastos. A partir de esto, se demostró la disminución en la actividad de ADAMTS13 asociada con el desarrollo de cirrosis hepática (Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al: Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 1019-1029 (referencia 5 que no es de patente)). También se informa que la enzima está presente en plaquetas, células endoteliales vasculares y podocitos del riñón.

35 No se aclara la importancia de la producción de la enzima en estos órganos y las células. Sin embargo, se considera que el hígado es el órgano más importante para mantener el nivel en sangre de ADAMTS13 (Yoshihiro Fujimura, *The Journal of Japanese College of Angiology* Vol. 51 No. 3, 2011 (referencia 6 que no es de patente)). Las razones para esto incluyen las dos siguientes: (1) pacientes terminales que padecen cirrosis biliar debido a atresia biliar congénita tienen la actividad de ADAMTS13 en sangre reducida al 20-30% y exhiben tres síntomas patológicos de microangiopatía trombótica (MAT), es decir, anemia hemolítica, reducción de plaquetas y disfunción renal pero, cuando se recibe un trasplante de hígado de donante vivo e injerto, los hallazgos de MAT ya no se observan (Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, et al: Liver Transplantation rescues a deficient state of von Willebrand factor cleaving protease activity in patients with liver cirrhosis due to congenital biliary atresia. *Blood* 2000; 96: 636a (resumen) (referencia 7 que no es de patente)); (2) la gravedad de los síntomas clínicos de los pacientes adultos con cirrosis principalmente debida a hepatitis C es paralela a la actividad de ADAMTS13 en sangre y, en una etapa terminal, la actividad se reduce al 20-30% (Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005; 106: 922-924 (documento 8 que no es de patente)).

40 En 2008, Chauhan et al. informó los resultados de que ADAMTS13 subregulaba tanto los trombos como la inflamación (Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, et al: ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* 2008; 205: 2065-2074 (referencia 9 que no es de patente)). Como tal, se muestra que ADAMTS13 tiene una actividad antiinflamatoria y una actividad antiinflamatoria y, por lo tanto, se espera que sea un agente terapéutico para el infarto cerebral. A saber, Zhao et al. (Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, et al: von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* 2009; 114: 3329-3334 (referencia 10 que no es de patente)) y Fujioka et al. (Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* 2010; 115: 1650-1653 (referencia 11 que no es de patente)) realizó un experimento de reperfusión de isquemia cerebral en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media de ratón para crear artificialmente un infarto cerebral y calculó un volumen de infarto cerebral para encontrar que los ratones con inactivación (KO) de ADAMTS13 aumentaron significativamente el volumen de infarto cerebral en comparación con el de los ratones de tipo silvestre (referencia 10 que no es de patente). La observación del tejido de la parte del infarto cerebral confirmó que el grupo de ratones con

5 inactivación tenía una gran cantidad de microtrombos y mucha infiltración de células inflamatorias. Se demostró que el trombo era el rico en FwW. La causa de que los ratones con inactivación presentaran un mayor nivel de infarto cerebral se consideró que era un trombo plaquetario que contenía una gran cantidad de FwW y una infiltración excesiva de glóbulos blancos. Además, también se informó que la administración de la preparación de ADAMTS13 humana basada en la expresión génica inmediatamente antes de la reperfusión a ratones de tipo silvestre redujo significativamente el nivel de infarto cerebral (referencia 11 que no es de patente). Como se describió anteriormente, a partir de los resultados obtenidos por el experimento con ratones, se muestra la posibilidad de una formulación de ADAMTS13 como medicamento para el tratamiento y profilaxis del infarto cerebral.

10 La pérdida de la actividad de ADAMTS13 está asociada con una serie de afecciones, por ejemplo, PTT (Moake JL, Semin Hematol. Enero de 2004; 41 (1): 4-14 (referencia 12 que no es de patente)), inflamación aguda y crónica (Chauhan et al., J Exp Med. 1 de septiembre de 2008; 205 (9): 2065-74 (referencia 9 que no es de patente)) y, más recientemente, paludismo grave por el parásito de la malaria falciparum (Plasmodium falciparum) (Larkin et al., PLoS Pathog, marzo de 2009; 5 (3): e1000349 (referencia 13 que no es de patente)).

15 La formulación de ADAMTS13 se ha utilizado para trastornos asociados con la formación y/o presencia de uno o más trombos. Ejemplos de trastornos asociados con la formación y/o presencia de uno o más trombos incluyen púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria, PTT adquirida, trombosis arterial, infarto agudo de miocardio (IAM), accidente cerebrovascular, sepsis y coagulación intravascular diseminada (CID).

20 La formulación de ADAMTS13 también se ha utilizado para el tratamiento o la prevención del infarto. Los ejemplos de infarto incluyen infarto de miocardio (ataque cardíaco), embolia pulmonar, evento cerebrovascular tal como accidente cerebrovascular, enfermedades de oclusión arterial periférica (gangrena, etc.), síndrome antifosfolípido, sepsis, arteritis de células gigantes (ACG), hernia y vólvulo intestinal.

25 El panfleto WO 2005/062054 (patente 1 de referencia) divulga un método para detectar el grado de trombofilia o trombosis midiendo ADAMTS13. Divulga que la trombosis incluye leucemia mielógena aguda o crónica, leucemia premielocítica aguda, lupus eritematoso sistémico, embolia pulmonar, infarto cerebral, enfermedad venooclusiva hepática, leucemia linfocítica aguda, microangiopatía trombótica, púrpura trombocitopénica trombótica, síndrome hemolítico-urémico y trombosis venosa profunda. Además, el panfleto WO 2006/049300 (referencia 2 de patente) divulga un método para detectar trombosis plaquetaria o trastorno orgánico en un paciente con CID o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) analizando ADAMTS13 y/o su factor de degradación (por ejemplo, elastasa, plasmina y trombina).

35 El documento JP 2007/088849 (referencia 3 de patente) divulga un método para entender las condiciones de CID analizando una cantidad y/o una actividad enzimática de ADAMTS13 en un paciente con coagulación intravascular diseminada (CID).

40 El documento JP 2009-539757 (referencia 4 de patente) divulga una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de ADAMTS13 que tiene actividad trombolítica.

45 El documento JP 2010-280571 (referencia 5 de patente) divulga un método para usar la proteína de la familia ADAMTS13 como ayuda celular para mejorar la tasa de supervivencia del injerto de las células del injerto, un suplemento de trasplante celular que comprende dicha proteína como un ingrediente eficaz, y un método para la preparación de células de injerto que comprende una etapa de añadir dicha proteína.

50 El documento JP 2013-505270 (referencia 6 de patente) divulga una formulación de ADAMTS13 que es adecuada para la administración de fármacos y puede almacenarse durante un largo período de tiempo sin pérdida de actividad o coagulación excesiva.

Hasta el presente, la relación de ADAMTS13 con daño hepático agudo y crónico, lesión por reperfusión por isquemia hepática, trasplante de hígado e insuficiencia hepática aguda/hepatitis fulminante apenas se ha aclarado y no se conocía el uso de ADAMTS13 como agente terapéutico para estas enfermedades.

55 [Estado de la técnica]

[Referencias de patente]

60 Referencia 1 de patente: panfleto WO 2005/062054
Referencia 2 de patente: panfleto WO 2006/049300
Referencia 3 de patente: JP 2007/088849
Referencia 4 de patente: JP 2009-539757
Referencia 5 de patente: JP 2010-280571
Referencia 6 de patente: JP 2013-505270

65

[Referencias que no son de patente]

Referencia 1 que no es de patente: Blood, 2008; 112: 11-18

Referencia 2 que no es de patente: J Clin Apher 2012; 27: 112-116

Referencia 3 que no es de patente: Br J Haematol 2012; 158: 323-335

5 Referencia 4 que no es de patente: McCord, N Engl J Med 1985; 312: 159

Referencia 5 que no es de patente: Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al: Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. Thromb Haemost 2008; 99: 1019-1029

10 Referencia 6 que no es de patente: Yoshihiro Fujimura, The Journal of Japanese College of Angiology Vol. 51 No. 3, 2011

Referencia 7 que no es de patente: Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, et al: Liver transplantation rescues a deficient state of von Willebrand factorcleaving protease activity in patients with liver cirrhosis due to congenital biliary atresia. Blood 2000; 96: 636a (resumen)

15 Referencia 8 que no es de patente: Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Blood 2005; 106: 922-924

20 Referencia 9 que no es de patente: Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, et al: ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. J Exp Med 2008; 205: 2065-2074

Referencia 10 que no es de patente: Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, et al: von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. Blood 2009; 114: 3329-3334

25 Referencia 11 que no es de patente: Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. Blood 2010; 115: 1650-1653

30 Referencia 12 que no es de patente: Moake JL, Semin Hematol. Enero de 2004; 41(1): 4-14

Referencia 13 que no es de patente: Larkin et al., PLoS Pathog. Marzo de 2009; 5(3): e1000349

35 Divulgación de la invención

(Problema técnico que debe resolver la invención)

40 El hígado es un órgano extremadamente importante que controla funciones importantes del cuerpo humano. Todavía existe la necesidad de un agente terapéutico eficaz y un agente de diagnóstico para el daño hepático agudo y crónico, el daño por reperfusión por isquemia hepática, la disfunción hepática en el trasplante de hígado y la insuficiencia hepática aguda/hepatitis fulminante.

(Medios para resolver los problemas)

45 En una cirugía hepática que incluye resección e implantación hepática, excluyendo el factor del tumor, el factor máximo que define el procedimiento quirúrgico es la función hepática (residual) y la capacidad de reserva hepática. La función hepática en el tratamiento médico moderno es solo la función de los hepatocitos. El hígado incluye células parenquimatosas (hepatocitos: aproximadamente 60%) y células no parenquimatosas (células sinusoidales que constituyen la pared sinusoidal del hígado; células endoteliales vasculares distintas de los hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas y similares: aproximadamente 40%). Hasta el momento, ha sido escaso que se evalúe la función de las células hepáticas no parenquimatosas en la cirugía hepática o en el tratamiento de muchas enfermedades hepáticas agudas y crónicas y la política de tratamiento se determina con base en los resultados obtenidos.

55 Los presentes inventores se centraron en las células hepáticas no parenquimatosas que no se han considerado hasta ahora y encontraron que la enfermedad hepática aguda y crónica se puede evaluar mediante la evaluación de la función de las células hepáticas no parenquimatosas y se puede determinar la política de tratamiento. En particular, los presentes inventores se centraron en las células estrelladas, una de las células hepáticas no parenquimatosas, y analizaron una proteína producida por dichas células, ADAMTS13, para determinar la función y expresión para encontrar significado diagnóstico de ADAMTS13 como marcador de "la función de células hepáticas no parenquimatosas" y también un efecto terapéutico drástico de una formulación recombinante de genes de ADAMTS13 en una prueba no clínica.

65 Los presentes inventores también han encontrado que ADAMTS13 ejerce un efecto terapéutico significativo en diversas enfermedades hepáticas tales como lesión por isquemia/reperfusión hepática, disfunción hepática después de un trasplante de hígado, insuficiencia hepática aguda y hepatitis fulminante para completar la presente invención.

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y descritas a continuación.

Por tanto, la presente invención se refiere a ADAMTS13 recombinante o un mutante del mismo para uso en el tratamiento y/o protección de lesión por isquemia-reperusión hepática causada por isquemia-reperusión que comprende isquemia por calor, en la que

(i) dicho mutante tiene una actividad enzimática para escindir el factor Von Willebrand (vWF), en el que los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de ADAMTS13 no están mutados;

(ii) dicho mutante comprende la unidad mínima necesaria para ejercer la actividad de ADAMTS13, en la que dicha unidad comprende el dominio de metaloproteasa y el dominio espaciador de ADAMTS13; y/o

(iii) dicho mutante es la proteína ADAMTS13W688X que es ADAMTS13 que carece de la porción del extremo terminal C, en la que dicha porción del extremo terminal C varía desde el aminoácido en la posición 689 al aminoácido en la posición 1427.

Se divulga en el presente documento un nuevo uso de una longitud completa o su fragmento parcial de ADAMTS13. Al utilizar ADAMTS13, como se divulga en el presente documento, es posible diagnosticar de forma rápida y precisa el daño hepático agudo y crónico y proporcionar un agente para tratar eficazmente el daño hepático, la lesión por isquemia/reperusión hepática, la disfunción hepática después de un trasplante de hígado y la insuficiencia hepática aguda/hepatitis fulminante.

Breve descripción de las figuras

Aunque se espera que la capacidad de reserva hepática sea suficientemente alta en vista de la función de los hepatocitos, también existe una afección patológica en la que se produce insuficiencia hepática después de la resección del hígado debido a la disminución extrema de la función de las células no parenquimatosas. Como ejemplo, la Figura 1 muestra la lesión por reperusión por almacenamiento en frío/calor en un trasplante de hígado. No hubo diferencia significativa de una enzima de desviación hepática (es decir, daño de los hepatocitos) después de la reanudación del flujo sanguíneo entre dos grupos de almacenamiento en frío durante 6 y 24 horas. Sin embargo, la actividad de ADAMTS13 se correlacionó inversamente con mucha precisión con la duración del almacenamiento en frío del injerto de hígado. Esto prueba que la reperusión isquémica en frío es más dañina para la pared sinusoidal que para los hepatocitos.

La Figura 2 es un gráfico que muestra que la esencia del daño hepático después de la quimioterapia del cáncer colorrectal es un trastorno de las células hepáticas no parenquimatosas. El daño de los hepatocitos (AST/ALT, etc.) fue leve y la función de los hepatocitos, como la capacidad de síntesis de proteínas y la capacidad de coagulación, estuvo dentro de un intervalo normal. Sin embargo, la actividad de ADAMTS13 se redujo a tan solo un 12% del hígado normal. Este es un trastorno de las células hepáticas no parenquimatosas que apenas se evalúa en el tratamiento médico moderno y es uno de los principales factores que causan disfunción hepática después de la resección hepática de un tumor hepático metastásico de cáncer colorrectal. NC: hígado normal; A24: 24 horas después de la administración de monocrotalina; A48: 48 horas después de la administración de monocrotalina; T24: 24 horas después de la administración de monocrotalina más el agente de tratamiento; T48: 48 horas después de la administración de monocrotalina más el agente de tratamiento.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los datos clínicos de que la actividad de ADAMTS13 en sangre se correlaciona inversamente con el grado de insuficiencia hepática (MELD: modelo de enfermedad hepática en etapa terminal, Child-Pugh: puntuación de Child).

La Figura 4 es un gráfico que muestra que la actividad de ADAMTS13 disminuye marcadamente en una etapa temprana después del trasplante de hígado de donante vivo.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los datos en los que se compara la actividad de ADAMTS13 después del trasplante de hígado entre un bebé y un adulto.

La Figura 6 es un gráfico que muestra que la recuperación de la actividad de ADAMTS13 se retrasa más en un injerto relativamente insuficiente incluso en el caso de un adulto.

La Figura 7 es un gráfico que muestra que tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 ocurren en una etapa temprana después del trasplante de hígado.

La Figura 8 es un gráfico que muestra que se observa un desequilibrio de FvW/ADAMTS13 después del trasplante de hígado.

- La Figura 9 ilustra un procedimiento experimental para investigar el papel de ADAMTS13 en una lesión por isquemia/reperfusión hepática.
- 5 La Figura 10 es un gráfico que muestra la actividad de ADAMTS13 en plasma después de la reperfusión.
- La Figura 11 es un gráfico que muestra el recuento de plaquetas y la liberación de LDH después de IRI.
- La Figura 12 es un gráfico que muestra la liberación de transaminasas después de IRI.
- 10 La Figura 13 es una fotografía que muestra que el daño tisular en ratones con inactivación mejora con la ADAMTS13 recombinante.
- La Figura 14 es un gráfico que muestra que el daño tisular en ratones con inactivación mejora con la ADAMTS13 recombinante.
- 15 La Figura 15 es una fotografía que muestra que una gran cantidad de coagulación plaquetaria en ratones con inactivación mejora mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante.
- La Figura 16 es un gráfico que muestra que una gran cantidad de coagulación plaquetaria en ratones con inactivación mejora mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante.
- 20 La Figura 17 es un gráfico que muestra que ADAMTS13 suprime la expresión de citocinas inflamatorias después de IRI.
- 25 La Figura 18 es un gráfico que muestra que ADAMTS13 suprime la expresión de citocinas y quimiocinas inflamatorias después de IRI.
- La Figura 19 ilustra un procedimiento experimental para investigar el papel de ADAMTS13 en la lesión por isquemia/reperfusión hepática.
- 30 La Figura 20 es un gráfico que muestra que tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 se producen por isquemia hepática/lesión por reperfusión.
- La Figura 21 es un gráfico que muestra el recuento de plaquetas y la liberación de LDH después de IRI.
- 35 La Figura 22 es un gráfico que muestra la liberación de transaminasas después de IRI.
- La Figura 23 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de los animales después de un trasplante parcial de hígado del 20%.
- 40 La Figura 24 es un gráfico que muestra la liberación de transaminasas después de un trasplante parcial de hígado del 20%.
- La Figura 25 es un gráfico que muestra la liberación de LDH y la trombocitopenia después de un trasplante de hígado parcial del 20%.
- 45 La Figura 26 es una fotografía que muestra que la normalidad del hígado trasplantado se mantuvo mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante de hígado parcial del 20% desde el punto de vista patológico.
- 50 La Figura 27 es un gráfico que muestra que la normalidad del hígado trasplantado se mantuvo mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante de hígado parcial del 20% desde el punto de vista patológico.
- 55 La Figura 28A es un gráfico que muestra los resultados de la RT-PCR cuantitativa que muestra que tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 se producen por isquemia hepática y reperfusión.
- La Figura 28B es un gráfico que muestra que la actividad de ADAMTS13 en sangre disminuye en aproximadamente un 30% por isquemia y reperfusión de hígado parcial del 70% y no se observa recuperación después de 24 horas.
- 60 La Figura 29 es un gráfico que muestra la actividad de ADAMTS13 en plasma después de la reperfusión (A) y el recuento de plaquetas en sangre periférica después de IRI (B) en cuatro grupos experimentales. Se demostró que el recuento de plaquetas en sangre periférica era proporcional a la actividad de ADAMTS13 en plasma (cuanto mayor es la actividad de ADAMTS13 en sangre, más se mantiene el recuento de plaquetas en sangre periférica).
- 65

- 5 La Figura 30 es una fotografía que muestra la inmunotinción por fluorescencia de CD42B del tejido hepático después de la isquemia hepática y la reperusión (las plaquetas en el tejido hepático se tiñen densamente de rojo con fluorescencia). Se muestra que se produce una gran cantidad de coagulación plaquetaria en el hígado de los ratones con inactivación de ADAMTS13 en comparación con el de los ratones de tipo silvestre, pero la coagulación de las plaquetas en el hígado mejora notablemente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante tanto en ratones con inactivación como en ratones de tipo silvestre.
- 10 La Figura 31 a la izquierda es la cuantificación de la inmunotinción de fluorescencia plaquetaria de la Figura 30 usando software de análisis de imágenes (Image-J, NIH, EE. UU.) y muestra que una gran cantidad de coagulación plaquetaria en ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre mejora notablemente mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante. La Figura 31 a la derecha es un gráfico que muestra la medición del flujo sanguíneo del tejido hepático (microcirculación) medido con un medidor de flujo Doppler con láser (O2C, LEA, Alemania). Se muestra que el flujo sanguíneo del tejido hepático (microcirculación) mejora con una correlación inversa con la formación de trombos plaquetarios en el tejido hepático.
- 15 La Figura 32 es un gráfico que muestra la liberación de transaminasas (A y B) y la liberación de LDH (C) después de IRI. Se demostró que el daño hepático se agravó en los ratones con inactivación de ADAMTS13 en comparación con los ratones de tipo silvestre, pero el daño hepático mejoró notablemente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante tanto en ratones con inactivación como en ratones de tipo silvestre.
- 20 La Figura 33 es una fotografía que muestra una imagen de tejido hepático después de isquemia hepática y reperusión. Se muestra que el daño tisular tanto en ratones con inactivación como en ratones de tipo silvestre mejora con la ADAMTS13 recombinante.
- 25 La Figura 34 es un gráfico que muestra que el daño tisular tanto en ratones con inactivación como en ratones de tipo silvestre mejora con la ADAMTS13 recombinante.
- 30 La Figura 35 es un gráfico que muestra que ADAMTS13 suprime la expresión de citocinas inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) y quimiocinas (CXCL-2, -10) después de IRI.
- 35 La Figura 36 es una fotografía y un gráfico que muestran inmunohistológicamente que la infiltración de macrófagos (monocitos) en ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre mejora con la ADAMTS13 recombinante.
- La Figura 37 es una fotografía y un gráfico que muestran inmunohistológicamente que la infiltración de neutrófilos en ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre mejora con la ADAMTS13 recombinante.
- La Figura 38 es una fotografía y un gráfico que muestran inmunohistológicamente que la muerte celular por apoptosis en ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre disminuye por la ADAMTS13 recombinante.
- 40 La Figura 39 es una fotografía durante la cirugía de un modelo de rata de trasplante parcial de hígado del 20%.
- La Figura 40 es un gráfico que muestra la actividad de ADAMTS13 después de la administración de la ADAMTS13 recombinante (W688X) a un modelo de trasplante de hígado parcial del 20%.
- 45 La Figura 41 es un gráfico que muestra la liberación de LDH (A) y la trombocitopenia (B) después de un trasplante de hígado parcial del 20%. Ambos mejoran en el grupo de administración de ADAMTS13.
- 50 La Figura 42 es una fotografía y un gráfico que muestra la inmunotinción por fluorescencia de CD42B después de un trasplante de hígado parcial del 20% (las plaquetas en el tejido hepático se tiñen densamente de rojo con fluorescencia). Se muestra que la coagulación plaquetaria en el hígado trasplantado disminuye marcadamente mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante parcial de hígado del 20%.
- 55 La Figura 43 es un gráfico que muestra la liberación de transaminasas después de un trasplante de hígado parcial del 20%. Se muestra que el daño hepático se suprime significativamente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante.
- 60 La Figura 44 es una fotografía y un gráfico que muestran que la normalidad del hígado trasplantado se mantuvo mediante la administración de ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante de hígado parcial del 20% desde el punto de vista patológico.
- 65 La Figura 45 es una fotografía y un gráfico que muestran la inmunotinción histológica del FvW, que provoca la coagulación plaquetaria, en el hígado trasplantado. Se muestra que el FvW, que originalmente no se expresa, se expresa excesivamente en el sinusoides del tejido hepático después del trasplante y que la expresión del FvW, que actúa como núcleo de la coagulación plaquetaria, disminuye marcadamente con la administración de la ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante hepático parcial del 20%.

La Figura 46 es una fotografía y un gráfico que muestra que las citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF α) y el vasoconstrictor (endotelina-1) disminuyen notablemente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante parcial de hígado del 20%.

5 <Papel de ADAMTS13 en el daño hepático agudo y crónico: como marcador de función de las células no parenquimatosas del hígado en diversas enfermedades hepáticas y posibilidad de ADAMTS13 recombinante del gen para aplicación terapéutica>

10 Como se describió anteriormente, los presentes inventores se centraron en las células hepáticas no parenquimatosas que hasta ahora no se han considerado y evaluado la función de las mismas. ADAMTS13 es producida y secretada por las células hepáticas no parenquimatosas, las células estrelladas. Por lo tanto, cuando el daño hepático es severo, la actividad de ADAMTS13 en sangre disminuye notablemente para no permitir la escisión de FvW-Multímeros, que actúan como un núcleo de la coagulación plaquetaria, para inducir así la microangiopatía trombótica (MAT).

15 Además, también se encontró que la función de las células hepáticas no parenquimatosas disminuye notablemente por el almacenamiento en frío del hígado trasplantado. Los presentes inventores han descubierto que no hubo una diferencia significativa de una enzima de desviación hepática (es decir, no hubo una diferencia significativa de daño de hepatocitos) entre dos grupos de almacenamiento en frío del hígado trasplantado durante 6 y 24 horas, pero que la actividad de ADAMTS13 se correlacionó inversamente con mucha precisión con la duración del almacenamiento en frío del hígado trasplantado, lo que sugiere que ADAMTS13 puede ser un índice que indique la integridad de las células sinusoidales que constituyen la pared sinusoidal del hígado.

25 Además, los presentes inventores han descubierto que la esencia del daño hepático después de la quimioterapia del cáncer colorrectal es un trastorno de las células hepáticas no parenquimatosas. Es decir, se descubrió que la esencia del daño hepático después de la quimioterapia del cáncer colorrectal (el llamado "hígado azul") es un hígado congestivo debido a la destrucción de las células sinusoidales. En su modelo animal, SOS (síndrome obstructivo sinusoidal), se encontró que la actividad de ADAMTS13 en el tejido hepático y en la sangre era un índice que indicaba con mucha precisión la integridad de las células sinusoidales que constituyen la pared sinusoidal del hígado. No se observaron diferencias de AST/ALT entre los grupos.

30 Además, los presentes inventores han descubierto que la actividad de ADAMTS13 en sangre se correlaciona inversamente con el grado de insuficiencia hepática (datos clínicos), lo que sugiere que ADAMTS13 también puede ser un índice para la función de las células hepáticas no parenquimatosas/sinusoides en enfermedades crónicas del hígado.

35 Además, los presentes inventores investigaron la actividad de ADAMTS13 en una etapa temprana después del trasplante de hígado de donante vivo para encontrar que la actividad disminuyó marcadamente en una etapa temprana después del trasplante de hígado en todos los casos, que en comparación con la actividad de ADAMTS13 después del trasplante de hígado entre un adulto y un lactante, la recuperación de la actividad de ADAMTS13 fue más rápida en el trasplante de adulto a lactante (injerto de hígado de una relación de peso de 1-5%) que en el trasplante de adulto a adulto (injerto de hígado de una relación de peso de 0,6 a 1,5%), y que en el caso del adulto, la recuperación de la actividad de ADAMTS13 se retrasó aún más en un injerto relativamente insuficiente, lo que sugiere que ADAMTS13 puede ser un índice para la función de las células hepáticas no parenquimatosas/sinusoides después del trasplante de hígado. Además, tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 ocurren en una etapa temprana después del trasplante de hígado y, por lo tanto, existe un desequilibrio de la relación FvW/ADAMTS13 y el daño hepático severo está potencialmente en el estado de pre-MAT. Después del trasplante de hígado, aunque el grado puede variar, casi todos los casos se encuentran en estado de pre-MAT. La disfunción de órganos después del trasplante de órganos (función de injerto retardada; FIR) es inducida por alteraciones de la microcirculación junto con la formación de trombos plaquetarios en el hígado trasplantado/disminución de plaquetas en sangre periférica. Esta es una condición letal para el trasplante de hígado parcial en el que la capacidad de reserva hepática es insuficiente.

50 A partir de lo anterior, se encontró que la disminución en la actividad de ADAMTS13 se observó para todas las afecciones agudas y crónicas, incluida la cirrosis, el período perioperatorio para el trasplante de hígado, SOS y almacenamiento en frío del hígado trasplantado y se encontró que estos se correlacionan con la función de las células sinusoidales. En el caso de las condiciones en las que se observa la actividad acelerada del FvW, por ejemplo, insuficiencia hepática aguda, tal como el período perioperatorio para el trasplante de hígado y la hepatitis fulminante, la MAT se desarrolla a partir de la formación del trombo plaquetario en el vaso sanguíneo debido al desequilibrio de FvW/ADAMTS13 y esto es fatal. Por lo tanto, se sugirió que ADAMTS13 no solo es útil como marcador de "la función de las células hepáticas no parenquimatosas", que no se ha considerado hasta ahora, sino que también es muy prometedor como agente terapéutico en daño hepático severo.

60 <Papel de ADAMTS13 en la lesión por isquemia/reperfusión hepática: investigación con ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre y efecto protector del gen de ADAMTS13 recombinante>

65

Usando ratones con inactivación de ADAMT13 y ratones de tipo silvestre, los presentes inventores investigaron en el modelo de lesión por reperfusión/isquemia hepática si la lesión por reperfusión/isquemia se exagera o no en ratones con inactivación de ADAMT13 y si la exacerbación se elimina o no mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante para encontrar que la lesión por reperfusión/isquemia hepática se exagera notablemente en ratones con inactivación de ADAMT13 y que la exacerbación se elimina por completo mediante la administración de ADAMTS13 recombinante, lo que sugiere que ADAMTS13 tiene un efecto protector significativo sobre la lesión por reperfusión/isquemia hepática. También se encontró que ADAMTS13 inhibió la expresión de citocinas inflamatorias después de IRI.

A continuación, los presentes inventores investigaron si el ADAMT13 recombinante puede ejercer o no un efecto protector en ratones de tipo silvestre así como en los ratones deficientes en ADAMT13. Como resultado, también en ratones de tipo silvestre (= adulto normal), tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 se produjeron por lesión de isquemia/reperfusión hepática, el desequilibrio de FvW/ADAMTS13 fue significativo y la lesión por isquemia/reperfusión hepática disminuyó significativamente con ADAMTS13, lo que sugiere que ADAMTS13 puede usarse como agente terapéutico para diversas enfermedades hepáticas en adultos normales que no tienen mutación genética.

<Papel de ADAMTS13 en el trasplante de hígado: investigación utilizando un modelo de trasplante de hígado parcial del 20% y efecto protector del gen de ADAMTS13 recombinante>

Como se describió anteriormente, el desequilibrio de FvW/ADAMTS13 se observa en todos los casos después del trasplante de hígado en mayor o menor medida y es extremo en el caso de muerte temprana ya que la actividad de ADAMTS13 producida por las células estrelladas disminuye marcadamente por el almacenamiento en frío inevitable para el trasplante de hígado y, cuanto menor sea el tamaño del hígado trasplantado, menor será la actividad de ADAMTS13 en una etapa temprana después de la cirugía. Viendo esto, usando un modelo de trasplante de hígado parcial de rata, los presentes inventores investigaron el efecto protector cuando la ADAMTS13 recombinante se administra después de un trasplante de hígado de un donante vivo adulto. Se examinó la tasa de supervivencia después de un trasplante parcial de hígado del 20%. La tasa de supervivencia al cuarto día fue del 100% y excelente en la toma de muestras, al mismo tiempo la supervivencia a los siete días fue del 60%, y el efecto del efecto terapéutico sobre la supervivencia podría evaluarse como un criterio de valoración principal. Como resultado, se encontró que la liberación de transaminasas se suprimió mediante la administración de ADAMTS13 recombinante y el daño de los hepatocitos después de un trasplante parcial de hígado del 20% se redujo significativamente. También se encontró que, mediante la administración de ADAMTS13 recombinante, se suprimió la liberación de LDH y la microangiopatía trombótica (condiciones de MAT) disminuyó significativamente. Desde el punto de vista patológico, la normalidad del hígado trasplantado se mantuvo mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante parcial de hígado del 20%. A partir de esto, se sugirió que la ADAMTS13 recombinante tenía un efecto protector sobre el hígado trasplantado incluso en un modelo de rata de trasplante de hígado parcial del 20% que imitaba el trasplante de hígado de donante vivo (adulto) y era prometedor como nuevo agente terapéutico.

<Efecto protector de ADAMTS13 en insuficiencia hepática aguda/hepatitis fulminante: estudio en modelo de insuficiencia hepática aguda en ratas utilizando tioacetamida (TAA)>

La tasa de mortalidad de la hepatitis fulminante sigue siendo alta en los últimos años y la tasa de salvamento de vidas es tan baja como el 40% en el tratamiento conservador (médico) y es del 80% incluso en el caso de trasplante de hígado. Los presentes inventores han descubierto que la tasa de supervivencia se volvió drásticamente alta cuando se administró ADAMTS13 recombinante en un modelo de insuficiencia hepática aguda de rata usando tioacetamida (TAA).

<ADAMTS13 y sus mutantes>

ADAMTS13, como se usa en este documento, es metaloproteasa de ADAMTS13 (una metaloproteína similar a desintegrina y con motivos 13 de trombospondina tipo 1) que escinde FvW entre los residuos Tyr1605 y Met1606. En el contexto de la presente invención, ADAMTS13 incluye la de, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, primate, humano (NP_620594), mono, conejo, cerdo, bovino (XP_610784), roedores, ratón (NP_001001322), rata (XP_342396), hámster, rata de arena, perro, gato, rana (NP_001083331), pollo (XP_415435) y similares, y derivados biológicamente activos de los mismos. ADAMTS13, como se usa en el presente documento, también incluye mutantes con actividad y proteínas ADAMT13 mutantes, así como fragmentos funcionales de proteínas ADAMTS13 y proteínas de fusión. Además, las proteínas ADAMT13 de la presente invención pueden incluir además etiquetas que faciliten la purificación, detección o ambas. La proteína ADAMTS13 descrita en el presente documento puede modificarse adicionalmente mediante una parte de tratamiento o una parte adecuada para la formación de imágenes *in vitro* o *in vivo*.

El término "derivado biológicamente activo" como se usa en este documento se refiere a cualquier polipéptido que tenga sustancialmente la misma función biológica que ADAMTS13. Una secuencia polipeptídica de un derivado biológicamente activo puede incluir eliminación, adición y/o sustitución de uno o más aminoácidos, cuya ausencia, presencia y/o sustitución no tiene un efecto negativo sustancial sobre la actividad biológica del polipéptido. La actividad

biológica del polipéptido puede medirse, por ejemplo, mediante la reducción o el retraso de la adhesión plaquetaria al endotelio, la reducción o el retraso de la agregación plaquetaria, la reducción o el retraso de la formación de cadenas plaquetarias, la reducción o el retraso de la formación de trombos, la reducción o el retraso del crecimiento de trombos, la reducción o el retraso de la oclusión del vaso sanguíneo, escisión proteolítica de FvW y el colapso de trombos, o por escisión de sustratos peptídicos como, por ejemplo, el péptido FRET-S-VWF73 (Kokame et al., Br J Haematol. Abril de 2005; 129 (1): 93-100) o un mutante del mismo.

Para ADAMTS13 como se usa en este documento, se pueden usar tanto ADAMTS13 derivada de la sangre (en lo sucesivo también denominada "nADAMTS13") como una ADAMTS13 recombinante (en lo sucesivo también denominada "rADAMTS13") obtenido mediante la técnica de recombinación génica. ADAMTS13, como se usa en este documento, también puede ser un mutante en el que se introduce una mutación en una parte de los aminoácidos de ADAMTS13 o una unidad mínima que tiene la actividad de escisión (en lo sucesivo también denominada "mADAMTS13") en la medida en que tengan la actividad enzimática para escindir FvW. Por lo tanto, ADAMTS13 a la que se hace referencia en la presente divulgación como referencia también incluye nADAMTS13, rADAMTS13 y mADAMTS13.

La ADAMTS13 humana incluye, pero no se limita a, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del GenBank con número de acceso NP_620594 o su producto procesado, por ejemplo, un polipéptido en el que se remueven un péptido señal (residuos de aminoácidos (1-29) y/o un propéptido (residuos de aminoácidos 30-74). Se conocen en la técnica muchos mutantes naturales de ADAMTS13 humana y están incluidos en la formulación de la presente invención, una parte de la cual incluye mutaciones seleccionadas de R7W, V88M, H96D, R102C, R193W, T196I, H234Q, A250V, R268P, W390C, R398H, Q448E, Q456H, P457L, P475S, C508Y, R528G, P618A, R625H, I673F, R692C, A732V, E740K, A900V, S903L, C908Y, C951G, G982R, C1024G, A1033T, R1095W, R1095W, R1123C, C1213Y, T1226I, G1239V and R1336W. ADAMTS13 incluye además proteínas naturales y recombinantes mutadas, por ejemplo, por una o más mutaciones conservadoras en aminoácidos no esenciales. Es preferible que los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de ADAMTS13 no estén mutados. Estos aminoácidos incluyen, por ejemplo, un residuo que se sabe o se estima que es esencial para la unión de metales, por ejemplo, los residuos en las posiciones 83, 173, 224, 228, 234, 281 y 284, y los residuos que se encuentran en el sitio activo de la enzima, por ejemplo, el residuo en la posición 225. De manera similar, en el contexto de la presente invención, ADAMTS13 también incluye una isoforma, por ejemplo, una isoforma que carece de los residuos de aminoácidos en las posiciones 275-305 y/o 1135- 1190 de la proteína humana de longitud completa.

Estas mutaciones pueden ser la generada espontáneamente o la generada por mutagénesis artificial. La mutagénesis artificial es bien conocida en la técnica e incluye, por ejemplo, mutagénesis específica de sitio usando un método recombinante, síntesis de polipéptidos mutantes por métodos químicos tales como, por ejemplo, síntesis en fase sólida y síntesis en fase líquida, o modificación química de residuos de aminoácidos cuyos detalles son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tal mutación y/o modificación puede estar en cualquier posición.

Para introducir una mutación puntual en el gen de ADAMTS-13 resultante, generalmente se puede usar mutagénesis dirigida al sitio. En la práctica, la introducción de una mutación puntual en el gen de ADAMTS-13W688X se realiza utilizando un kit disponible comercialmente tal como el Site-Directed Mutagenesis System (Takara: Mutan-Super Express Km, Mutan-Express Km, Mutan-K, y similares), QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) y GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) aplicando dicha técnica de acuerdo con el protocolo adjunto.

En particular, cuando se produce ADAMTS13 de la presente invención en un sistema de expresión de células eucariotas, existe una alta posibilidad de que se añadan cadenas de azúcar a los residuos de serina o treonina en el polipéptido. Por tanto, ADAMTS13 que se expresa en células eucariotas y se le añade cadenas de azúcar también se incluye en la presente invención.

Mediante la incorporación del gen de ADAMTS13 o el gen de mADAMTS13 con la introducción de una mutación puntual en un vector de expresión apropiado y la transformación de un huésped con el vector de expresión, se realiza la expresión de la ADAMTS13 recombinante (proteína rADAMTS13) y sus mutantes (proteína mADAMTS13). Para un huésped, como se usa comúnmente para la expresión de una proteína extraña, se pueden usar bacterias, levaduras, células animales, células vegetales y células de insectos. Sin embargo, se puede utilizar cualquier huésped siempre que se mantenga sustancialmente la misma función biológica que ADAMTS13. Cuando la proteína rADAMTS13 o la proteína mADAMTS13 se purifican a partir de células que producen estas proteínas, se usa un método de purificación comúnmente utilizado en la química de proteínas. Las modificaciones mencionadas anteriormente también se pueden realizar mediante un método químico.

De manera similar, ADAMTS13 puede modificarse adicionalmente mediante, por ejemplo, una modificación postraduccional (por ejemplo, la glicosilación de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados entre los residuos humanos 142, 146, 552, 579, 614, 667, 707, 828, 1235, 1354, o sitios modificados natural o artificialmente), o por modificación química o enzimática *ex vivo* que incluye, pero no se limita a, glicosilación, modificación con polímeros solubles en agua (por ejemplo, PEGilación, sialilación, modificación con HES, etc.) y etiquetado.

Los ejemplos de modificación de aminoácidos incluyen acetilación, acilación, amidación, adición de una cadena de azúcar, adición de un nucleótido o derivado de un nucleótido, adición de un lípido o derivado de un lípido, ciclación, formación de un enlace disulfuro, desmetilación, entrecruzamiento, formación de cistina, formación de ácido piroglutámico, formilación, hidroxilación, halogenación, metilación, oxidación de una cadena lateral, tratamiento con una proteinasa, fosforilación, sulfatación, racemización, etc., que son bien conocidos en la técnica.

Es particularmente preferible en la presente invención como mutante de ADAMTS13 una molécula que contiene una unidad mínima de ADAMTS13 que ejerce la actividad, es decir, desde un dominio de metaloproteasa a un dominio espaciador de ADAMTS13, en particular, el mutante de eliminación del extremo terminal C W688X (véase el panfleto WO 2004/029242; Soejima, K. et al.: ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*, 102: páginas 3232-3237, 2003; en lo sucesivo también denominado "proteína ADAMTS -13W688X") proporcionado eliminando los residuos de aminoácidos que van desde el aminoácido 689 hasta el extremo terminal C de los 1427 residuos de aminoácidos de ADAMTS13. El gen W688X que codifica la unidad mínima de ADAMTS13 que ejerce la actividad (en lo sucesivo también denominado "gen de ADAMTS13") puede obtenerse, por ejemplo, diseñando un cebador de PCR sobre la base de la secuencia descrita en la referencia 7 que no es de patente y la referencia 3 de patente y realizando una PCR utilizando como plantilla un ADNc derivado de órganos humanos o células productoras de ADAMTS13. En particular, el gen de ADAMTS13 se puede preparar como se describe a continuación. Primero, los ARN totales se extraen de los hepatocitos humanos y luego los ARNm se purifican a partir de ellos. Los ARNm resultantes se convierten en ADNc, luego se lleva a cabo la reacción de PCR utilizando cebadores de PCR diseñados en función de cada una de las secuencias de genes, y los productos de PCR resultantes se incorporan en un vector plasmídico que se introduce en *E. coli*. El clon que contiene ADNc que codifica la proteína deseada se elige entre las colonias de *E. coli*. Para la extracción de los ARN totales, se pueden usar reactivos disponibles comercialmente tales como el reactivo TRIzol (GIBCO BRL) e ISOGEN (NIPPON GENE Co., Ltd.). Para la purificación de los ARNm, se pueden usar kits disponibles comercialmente, como el kit de purificación de ARNm (Amersham BioSciences). Para la conversión en ADNc, se pueden usar kits disponibles comercialmente para preparar una biblioteca de ADNc tales como el sistema de plásmido SuperScript para la síntesis de ADNc y la clonación de plásmidos (GIBCO BRL). Para obtener prácticamente el gen de ADAMTS13, se puede usar una biblioteca de ADNc disponible comercialmente como por ejemplo, ADNc de hígado humano Marathon-Ready (BC Bioscience). Los cebadores de PCR están disponibles a través de empresas a cargo de la síntesis de ADN (por ejemplo, QIAGEN). Se prefiere que la secuencia de KOZAK (Kozak M, *J. Mol. Biol.*, 196, 947 (1987)) y una secuencia adecuada de un sitio de escisión de enzima de restricción se agreguen al lado 5' del cebador. La reacción de PCR se puede realizar utilizando un kit de PCR Advantage HF-2 disponible comercialmente (BC Bioscience) de acuerdo con el protocolo adjunto. La secuencia de bases de los fragmentos de ADN obtenidos de la PCR se determina mediante un secuenciador de ADN, por ejemplo, el sistema de análisis de ADN CEQ2000XL (Beckman) después de la clonación utilizando un kit de clonación TA (Invitrogen Corporation), etc.

Para purificar la proteína ADAMTS13 o el mutante de ADAMTS13 de las células que producen dicha proteína, puede usarse un método de purificación generalmente usado en la química de proteínas. El método de purificación incluye, por ejemplo, centrifugación, precipitación por salado, ultrafiltración, precipitación isoelectrónica, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita y cromatografía de resina CS en combinación de los mismos. Se puede medir una cantidad de la proteína obtenida usando un reactivo para la medición de proteínas tal como el kit de reactivos de ensayo de proteínas BCA (Pierce Biotechnology, Inc), el kit de ensayo de proteínas (BIO-RAD, Inc) y similares.

La detección de la proteína ADAMTS13 puede realizarse mediante un método basado en el tamaño molecular tal como SDS-PAGE, filtración en gel y similares o un método basado en una reacción antígeno-anticuerpo tal como ELISA, transferencia Western, transferencia de puntos y similares. Todos los métodos anteriores se usan comúnmente para determinar una proteína extraña y pueden seleccionarse de acuerdo con el propósito. Se puede medir una cantidad de la proteína ADAMTS13 obtenida usando un reactivo para la medición de proteínas tal como el kit de reactivos de ensayo de proteínas BCA (Pierce Biotechnology, Inc), el kit de ensayo de proteínas (BIO-RAD, Inc) y similares.

La actividad enzimática de ADAMTS13 puede medirse, por ejemplo, mediante un método que usa electroforesis en agarosa de SDS (M. Furlan et al., *Blood*, EE.UU., 1997, Vol. 89, páginas 3097-3103), ELISA usando un antígeno recombinante del dominio A2 del sustrato FvW (Whitelock JL et al., *Journal of thrombosis and hemostases*, RU, 2004, Vol. 2, 485-491), o un método que utiliza el sustrato fluorescente extintor FRET5-VWF73, que es un péptido sintético correspondiente a 73 residuos de Asp1596-Arg1668 en el dominio A2 del FvW en el que se introducen un grupo fluorescente [2-(N-metilamino)benzoilo, Nma] y un grupo de extinción (2,4-dinitrofenilo, Dnp) (Kokame K et al., *British Journal of Hematology*, RU, 2005, Vol. 129, 93-100). La actividad enzimática de ADAMTS13 puede medirse mediante un método descrito en la solicitud de patente japonesa No. 2005-148793, específicamente, un método analítico que comprende (1) una etapa de poner en contacto una muestra a analizar que se sospecha que contiene ADAMTS13 y un sustrato inmovilizado que es un portador insoluble al que se une el FvW o un fragmento del mismo en una solución, (2) una etapa de separación de la solución y el portador insoluble, y (3) una etapa de analizar el FvW o un fragmento del mismo que permanece en el portador insoluble y/o FvW o un fragmento del mismo que se libera del vehículo insoluble y está presente en la solución.

Para evaluar la actividad de la proteína ADAMTS13, puede medirse la actividad para unirse o degradar FvW derivado de plasma humano o péptido de FvW parcialmente sintetizado mediante un método tal como ELISA y similares usando un anticuerpo contra ADAMTS13 o un anticuerpo a una etiqueta cuando se utiliza un anticuerpo con etiqueta. El ELISA se puede construir mediante un procedimiento común. El FvW derivado de plasma humano y un anticuerpo contra ADAMTS13 para ELISA se pueden obtener de acuerdo con los métodos de Soejima, K. et al. (J. Biochem., 130: páginas 475-480, 2001) y Soejima, K. et al. (J. Biochem., 139: páginas 147-154, 2006). Puede usarse un FRET-S-VWF73 marcado con fluorescencia disponible comercialmente (PEPTIDE INSTITUTE, INC.) como un péptido parcialmente sintetizado de FvW.

10 <Composición y formulación de ADAMTS13>

ADAMTS13 o su mutante de la presente invención puede formularse en una preparación farmacéutica para tratamiento, diagnóstico u otros usos. Por ejemplo, para preparar una preparación para administración intravenosa, una composición generalmente se puede disolver en una solución acuosa que contiene materiales fisiológicamente compatibles tales como cloruro de sodio, glicina, etc. y que tiene un pH tamponado fisiológicamente compatible. Puede emplearse una formulación liofilizada como forma final para permitir una estabilidad prolongada. Las regulaciones del Gobierno establecen una guía para una composición para administración intravenosa, por ejemplo, "Requisitos mínimos para productos biológicos". Una composición farmacéutica de la presente invención que comprende como ingrediente activo ADAMTS13 o su mutante puede usarse específicamente en pacientes que tienen un nivel reducido de ADAMTS13, tal como pacientes con daño hepático, lesión por isquemia/reperfusión hepática, función hepática después de un trasplante de hígado y/o insuficiencia hepática aguda/hepatitis fulminante. Alternativamente, dicha composición farmacéutica puede usarse como un tratamiento complementario en pacientes con una concentración elevada en sangre de FvW, un sustrato de esta enzima, o en pacientes que se prevé que desarrollen FvWIG debido a inflamación, etc.

La composición farmacéutica de la presente invención, además de ADAMTS13 o su mutante, puede comprender además un aditivo farmacéuticamente aceptable comúnmente utilizado en una preparación farmacéutica (por ejemplo, un vehículo, un excipiente, un diluyente y similares), un agente estabilizador o un ingrediente farmacéuticamente necesario. El agente estabilizante incluye monosacáridos tales como glucosa, disacáridos tales como sacarosa y maltosa, alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol, sales neutras tales como cloruro de sodio, aminoácidos como glicina, polietilenglicol, copolímero de polioxietilén-polioxipropileno (pluronic), tensioactivos no iónicos tales como éster de ácido graso de polioxietilensorbitán (Tween), albúmina humana y similares. La composición farmacéutica de la presente invención incluye además otros agentes, un agente auxiliar, un promotor de la permeación tisular, un agente solubilizante y similares. Dichos materiales no son tóxicos y no interfieren con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, administración oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular o intraperitoneal. El portador u otro material pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de la vía de administración. Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar una composición farmacéutica y una formulación.

La composición farmacéutica que comprende ADAMTS13 o su mutante de la presente invención puede formularse, por ejemplo, para administración intravenosa (p. ej., como un bolo o mediante inyección sostenida durante un largo período de tiempo), por vía de administración intramuscular, intraperitoneal, intracerebral e intramedular, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intraespinal, oral, tópica o inhalatoria. En determinadas realizaciones, la formulación de ADAMTS13 de la presente invención puede administrarse por vía sistémica o tópica. La administración sistémica incluye, pero no se limita a, administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, nasal, sublingual o rectal. La administración tópica incluye, pero no se limita a, administración tópica, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

La composición farmacéutica para administración oral puede ser comprimidos, cápsulas, polvos o líquidos. Los comprimidos pueden incluir vehículos sólidos como gelatina o adyuvantes. La composición farmacéutica en líquido se compone típicamente de un vehículo líquido como agua, vaselina, aceites animales, aceites vegetales, aceites minerales o aceites sintéticos, incluida la solución salina, una solución de glucosa u otro sacárido o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

En el caso de inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o inyección en un sitio doloroso, un ingrediente activo no incluye un pirógeno, y es preferible una solución acuosa que tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados y que pueda recibirse extra intestinalmente. Los expertos en la técnica pueden preparar una solución adecuada utilizando, por ejemplo, medios isotónicos tales como una solución de cloruro de sodio, una solución de Ringer o una solución de lactato de Ringer. La solución puede comprender un conservante, un agente estabilizante, un tampón, un antioxidante y/u otros aditivos según sea necesario.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en una cantidad eficaz mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea o similares y se administran una o varias veces. La dosis varía dependiendo de los síntomas, la edad, el peso corporal, etc. y es de 100 a 700 unidades/kg de peso corporal, preferiblemente de 300 a 700 unidades/kg, más preferiblemente de 400 a 700 unidades/kg, por administración. Es más preferible una pluralidad de administraciones repetidas o administraciones sostenidas para el mantenimiento del valor de la actividad en sangre.

<ADAMTS13 como biomarcador>

Como referencia, se divulga el uso de ADAMTS13 como un biomarcador para monitorizar la aparición de daño hepático, lesión por isquemia/reperfusión hepática o la función hepática después de un trasplante de hígado. Además, se divulga como referencia un método para probar el daño hepático, un método para probar la lesión por isquemia/reperfusión hepática o un método para probar la función hepática después del trasplante de hígado, comprendiendo cada uno de los métodos medir o monitorizar la actividad de ADAMTS13 en una muestra de células hepáticas no parenquimatosas de un mamífero.

Un método de prueba de este tipo se realiza utilizando una muestra biológica de un paciente. Estas muestras se pueden usar directamente sin pretratamiento, o se puede realizar un tratamiento tal como la eliminación de sustancias en una muestra que pueden interferir mediante centrifugación o filtración antes de realizar el ensayo. Como muestra de prueba, por ejemplo, es preferible sangre en forma de plasma o suero, pero también se pueden utilizar varios fluidos corporales tales como, por ejemplo, líquido de tejido celular, linfa, fluido del timo, ascitis, líquido amniótico, fluido gástrico, orina, fluido pancreático, líquido de médula ósea o saliva. El plasma es preferiblemente plasma con citrato o plasma con heparina.

De acuerdo con el método de prueba divulgado en este documento como referencia, se mide la actividad de ADAMTS13 en una muestra biológica de un paciente y, cuando la actividad es menor que una actividad dada, se determina el daño hepático, lesión por isquemia/reperfusión hepática o disfunción hepática después del trasplante de hígado, en el que la actividad de ADAMTS13 se evalúa generalmente de la siguiente manera: hasta un 10%: posibilidad de enfermedad grave de la sangre o enfermedad hepática, necesidad urgente de tratamiento; 11-30%: posibilidad de enfermedad grave de la sangre o enfermedad hepática, necesidad de evaluación; 31-80%: necesidad de un examen detallado; 81% o más: normal. En caso de daño hepático, la evaluación es la siguiente: hasta un 10%: insuficiencia hepática grave; 11-30%: disfunción hepática grave; 31-50%: necesidad de un examen detallado; 51-80%: es preferible un examen detallado; 81% o más: normal. Además, después del trasplante de hígado, la evaluación es la siguiente: hasta un 10%: disfunción hepática después del trasplante, necesidad de intervención terapéutica; 11-30%: disfunción hepática después del trasplante, necesidad de intervención terapéutica o de una intervención de tratamiento principal o seguimiento estricto; 31-50%: seguimiento estricto; 51-80% (dependiendo de los días postoperatorios): seguimiento; 81% o más (dependiendo de los días postoperatorios): evolución satisfactoria.

De acuerdo con el método divulgado en el presente documento, un método para analizar la actividad de ADAMTS13 no está particularmente limitado en la medida en que pueda determinar cuantitativa o semicuantitativamente la actividad de ADAMTS13 e incluye, por ejemplo, un enfoque inmunológico usando un anticuerpo anti-ADAMTS13 o un fragmento del mismo (por ejemplo, inmunoensayo enzimático, inmunoensayo de agregación de látex, inmunoensayo de quimioluminiscencia, método de anticuerpos fluorescentes, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, tinción inmunohistoquímica, y transferencia Western y similares), enfoque bioquímico (por ejemplo, medición enzimática) o un enfoque de biología molecular que mide la cantidad de ARNm y similares. Cuando se usa un enfoque inmunológico para el análisis de ADAMTS13, se puede preparar un anticuerpo anti-ADAMTS13 de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, el método descrito en el panfleto WO 2004/029242, y la medición inmunológica se puede llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el panfleto WO 2004/029242.

Como método para medir la actividad de ADAMTS13, es preferible un método inmunológico por la sensibilidad y simplicidad. Un método inmunológico incluye varios métodos, por ejemplo, un método competitivo con una ADAMTS13 marcada, un método tipo sándwich con un anticuerpo marcado, un método de perlas de látex en el que se observa la agregación de perlas recubiertas con un anticuerpo o un método que utiliza un anticuerpo unido a partículas coloreadas como el coloide de oro. Sin embargo, el método que usa el anticuerpo para ADAMTS13 es la opción preferida. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. También se puede utilizar un fragmento de anticuerpo como Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

De acuerdo con el método divulgado en el presente documento, además de la actividad de ADAMTS13 en una muestra, también se puede medir la concentración de FvW y, a partir de la relación de ambos, se puede monitorizar el daño hepático, lesión por isquemia/reperfusión hepática o disfunción hepática después del trasplante de hígado. En caso de microangiopatía trombótica (MAT), se produce un desequilibrio de la relación FvW/ADAMTS13 (la actividad de FvW aumenta notablemente mientras que la actividad de ADAMTS13 disminuye notablemente). Por lo tanto, midiendo la actividad de FvW y ADAMTS13 y examinando la relación de los valores medidos, se pueden controlar las enfermedades mencionadas anteriormente. A este respecto, preferiblemente se determina de antemano un umbral para la realizar para varias determinaciones, por ejemplo, un umbral para la determinación de la concentración de ADAMTS13 y la actividad de ADAMTS13, y un umbral para la determinación de la relación entre la concentración de ADAMTS13 o la actividad del mismo para el FvW.

Un método para medir la concentración de FvW incluye, por ejemplo, un método de medición de la actividad mediante la actividad de agregación de plaquetas humanas y cofactor de ristocetina (Allain JP et al., J Lab Clin Med. UAS, 1975, Vol. 85, páginas 318-328) o un inmunoensayo usando un anticuerpo anti-FvW (Brown JE et al., Thromb Res. EE.UU.,

1986, Vol.43, páginas 303-311), y similares. Es preferible un método inmunológico desde el punto de vista de la sensibilidad y la sencillez.

<Kit>

5 Se divulga como referencia un kit para monitorizar la aparición de daño hepático, un kit para monitorizar la lesión por isquemia/reperfusión hepática y un kit para monitorizar la función hepática después del trasplante de hígado, cada uno de los kits comprende un medio para medir la actividad de ADAMTS13 en una muestra de un mamífero.

10 De acuerdo con el kit divulgado en el presente documento como referencia, los medios para medir la actividad de ADAMTS13 en una muestra pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-ADAMTS13 o un fragmento del mismo. Se incluyen preferiblemente dos o más anticuerpos anti-ADAMT13 diferentes. El anticuerpo anti-ADAMTS13 puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En caso de que se incluyan dos o más anticuerpos anti-ADAMT13 diferentes, se puede usar (segundo anticuerpo) cualquiera los dos como un anticuerpo marcado, o en lugar de
15 marcación, se puede añadir adicionalmente al kit un anticuerpo marcado en el que un marcador se une a un anticuerpo del segundo anticuerpo al kit.

Se divulga adicionalmente como referencia un método para medir la actividad de ADAMTS13 en células hepáticas no parenquimatosas tomadas de un mamífero y para detectar la reducción de la actividad de ADAMTS13. La reducción de la actividad de ADAMTS13 en células hepáticas no parenquimatosas de un mamífero puede ser un índice de adquisición de las enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en daño hepático, daño por isquemia/reperfusión hepática y disfunción hepática después del trasplante de hígado en un mamífero.

A continuación se explica la presente invención con más detalle mediante ejemplos. La invención reivindicada se refiere a una lesión por isquemia-reperfusión hepática causada por isquemia-reperfusión que comprende isquemia por calor. Se describen ejemplos relacionados con otras enfermedades como referencia.

[Ejemplo 1]

30 <La función de las células hepáticas no parenquimatosas disminuye notablemente con el almacenamiento en frío del hígado trasplantado>

Después de que se extrajo todo el hígado de las ratas (Rata Wistar, macho, 250 a 270 g), se midió la actividad de ADAMTS13 en el tejido hepático después de un simple almacenamiento en frío en una solución de HTK durante 6
35 horas y 24 horas y se representó gráficamente con una relación relativa al 100% del valor de actividad promedio en cuatro casos de hígado normal de rata sin almacenamiento (Figura 1). La actividad de ADAMTS13 se midió mediante FRET (FRETS-VWF73: PEPTIDE INSTITUTE, INC.).

Como resultado, no hubo diferencia significativa de una enzima de desviación hepática (ninguna diferencia significativa de daño de hepatocitos) entre dos grupos de almacenamiento en frío del hígado trasplantado durante 6 y 24 horas, pero la actividad de ADAMTS13 en el tejido hepático se correlacionó inversamente en forma muy precisa con la duración del almacenamiento en frío del hígado trasplantado (Figura 1).

[Ejemplo 2]

45 <La esencia del daño hepático después de la quimioterapia del cáncer colorrectal es un trastorno de las células hepáticas no parenquimatosas>

El oxaliplatino, uno de los fármacos clave de la quimioterapia para el cáncer colorrectal, causa daño hepático a un ritmo elevado. La esencia de la condición patológica es el síndrome obstructivo sinusoidal (SOS) causado por la destrucción de las células sinusoidales por el oxaliplatino. Utilizando un modelo de administración de monocrotalina comúnmente utilizado como modelo animal del SOS, se compararon los valores de actividad de ADAMTS13 después de 24 y 48 horas de administración con o sin la administración del agente de tratamiento (en cada grupo, n = 5). Como en la Figura 1, se tomó tejido hepático y se realizó la cuantificación mediante FRET.

55 NC: hígado normal

A24: 24 horas después de la administración de monocrotalina

60 A48: 48 horas después de la administración de monocrotalina

T24: 24 horas después de la administración de monocrotalina más el agente de tratamiento

T48: 48 horas después de la administración de monocrotalina más el agente de tratamiento

65

Como resultado, la actividad de ADAMTS13, que disminuyó notablemente antes de la administración del agente de tratamiento, se recuperó notablemente después de la administración del agente de tratamiento (Figura 2). A partir de esto, se encontró que la esencia del daño hepático después de la quimioterapia del cáncer colorrectal es el hígado congestivo debido a la destrucción de las células sinusoidales y que la actividad de ADAMTS13 en el tejido hepático y en la sangre era un índice que indicaba con mucha precisión la integridad de las células sinusoidales que constituyen la pared sinusoidal del hígado. No se observaron diferencias en el índice de daño de los hepatocitos, AST/ALT, entre los grupos.

[Ejemplo 3]

<La actividad de ADAMTS13 en sangre se correlaciona inversamente con el grado de insuficiencia hepática>

Se monitorizó un valor de actividad de ADAMTS13 preoperatorio, una puntuación del MELD (modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal), que se usa más ampliamente en todo el mundo como índice de insuficiencia hepática, y una puntuación de Child-Pugh en 21 casos de donantes y receptores de un trasplante parcial de hígado de donante vivo adulto realizado en el Hospital Universitario de Kyoto, División de Cirugía y Trasplante Hepato-Pancreato-Biliar y Trasplantes desde noviembre de 2012 hasta marzo de 2013. Como resultado, el valor de actividad preoperatoria de ADAMTS13 mostró un valor inverso muy clara correlación con la puntuación del MELD y la puntuación de Child-Pugh (Figura 3). Es decir, se considera que el valor de actividad de ADAMTS13 en sangre es útil como índice de insuficiencia hepática.

[Ejemplo 4]

<Actividad de ADAMTS13 en la etapa inicial después del trasplante de hígado de donante vivo>

Se monitorizó un valor de actividad de ADAMTS13 en sangre en 95 casos de trasplante de hígado parcial de donante vivo realizado en el Hospital Universitario de Kyoto, División de Cirugía y Trasplante Hepato-Pancreato-Biliar y Trasplantes en días consecutivos antes de la cirugía de los receptores hasta dos semanas después de la cirugía a partir de octubre de 2010 a marzo de 2012. Es evidente que el valor de la actividad de ADAMTS13 en sangre disminuyó en una etapa temprana después del trasplante de hígado en todos los casos.

Como resultado, se encontró que la actividad de ADAMTS13 disminuyó notablemente en una etapa temprana después del trasplante de hígado de donante vivo (Figura 4). Los resultados descritos anteriormente demuestran el efecto del almacenamiento en frío del hígado trasplantado sobre las células no parenquimatosas, las células sinusoidales que constituyen la pared sinusoidal del hígado, mediante la cuantificación de las proteínas producidas a partir de las células estrelladas, una de las células no parenquimatosas.

[Ejemplo 5]

<Actividad de ADAMTS13 después del trasplante de hígado (lactante frente a adulto)>

95 casos de trasplante de hígado parcial de donante vivo realizado en el Hospital Universitario de Kyoto, División de Cirugía y Trasplante Hepato-Pancreato-Biliar y Trasplantes desde octubre de 2010 hasta marzo de 2012 se dividieron en casos de lactantes (n = 29) y casos de adultos (n = 66) y se comparó y estudió el valor de actividad de ADAMTS13 después del trasplante de hígado.

El hígado es el órgano sólido más grande que corresponde a aproximadamente el 2% (volumen de hígado estándar) del peso corporal. El trasplante de adulto a lactante se realiza a menudo con un injerto de hígado con una relación en peso de 1 a 5%, mientras que el trasplante de adulto a adulto se realiza a menudo con una relación de peso de 0,6 a 1,5% de injerto de hígado. La recuperación de la actividad de ADAMTS13 en el caso de un lactante fue significativamente buena ya que la capacidad relativa del hígado implantado en el caso de un lactante fue mayor que la de un adulto (Figura 5).

[Ejemplo 6]

<La recuperación de la actividad de ADAMTS13 se retrasa aún más en un injerto relativamente insuficiente incluso en el caso de adultos>

Los 66 casos de adultos descritos anteriormente se dividieron en dos grupos de 1,0% o más y menos de 1,0% de una relación en peso del hígado del peso de hígado injertado/peso del receptor (GRWR) y se comparó y estudió el valor de actividad de ADAMTS13 después del trasplante de hígado. La recuperación de la actividad de ADAMTS13 en el caso del grupo con menos del 1,0% de GRWR (27 casos) tendió a retrasarse en comparación con el grupo con el 1,0% o más de GRWR (39 casos).

A partir de lo anterior, se encontró que el valor de actividad de ADAMTS13 en la sangre del receptor después del trasplante de hígado estaba bien correlacionado con GRWR, la capacidad de reserva del hígado del injerto, lo que

sugiere que ADAMTS13 puede ser un índice para la función de las células no parenquimatosas hepáticas/sinusoides después del trasplante de hígado (Figura 6).

[Ejemplo 7]

<Tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 ocurren en la etapa temprana después del trasplante de hígado>

Ambos valores de actividad del factor von Willebrand en sangre (FvW; que se convierte en un núcleo del trombo plaquetario, fisiológicamente juega un papel como punto de partida del mecanismo hemostático y también es un punto de partida de una condición patológica que causa una agregación excesiva de plaquetas en el trastorno del endotelio vascular o similar), y ADAMTS13, que es un trombo plaquetario que escinde enzimas, se midieron en 95 casos de trasplante parcial de hígado de donante vivo adulto realizado en el Hospital Universitario de Kyoto, División de Cirugía y Trasplante Hepato-Pancreato-Biliar y Trasplantes a partir de julio de 2013 a marzo de 2015, y se compararon y estudiaron (Figura 7). Además, se reveló que la proporción relativa de FvW/ADAMTS13 (proporción normal es 1 cuando ambas actividades en el plasma humano normal son 100%) fue 10 veces o más superior en todos los pacientes después de un trasplante de hígado (Figura 8, izquierda) y 30 veces o más en casos de muerte temprana (Figura 8, derecha) en tendencia a la formación de trombos plaquetarios.

Como resultado, se encontró que tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 ocurren en una etapa temprana después del trasplante de hígado (Figura 7). Además, se demostró que el desequilibrio de FvW/ADAMTS13 se producía tras el trasplante de hígado en casi todos los casos (Figura 8). A partir de esto, se sugirió que el daño hepático severo estaba potencialmente en el estado de pre-MAT. Es decir, se sugirió que la disfunción orgánica después del trasplante de órganos (función retardada del injerto; FIR) fue inducida por alteraciones de la microcirculación junto con la formación de trombos plaquetarios en el hígado trasplantado/disminución de plaquetas en sangre periférica. Esto se considera una condición letal para el trasplante parcial de hígado en el que la capacidad de reserva hepática es insuficiente.

[Ejemplo 8]

<Papel de ADAMTS13 en la lesión por isquemia/reperfusión hepática: investigación con ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre y efecto protector del gen de ADAMTS13 recombinante>

Se adquirieron 26 ratones ADAMTS13KO macho (129^{+/Ter}/SvJcl-TgH NCVC; 8-12 semanas de edad, 25-30 g) del Instituto Nacional de Investigación del Centro Cerebral y Cardiovascular (Osaka) y se obtuvieron los ratones de tipo silvestre correspondientes de CLEA Japan (Osaka). Se utilizó un modelo de ratón de IRI hepática parcial con calor. Todos los ratones se anestesiaron generalmente con isoflurano y se interrumpió el suministro de sangre de la arteria/vena portal a los lóbulos del hígado izquierdo/medio. Después de 90 min de isquemia, se reperfundieron los lóbulos isquémicos. Para investigar el impacto de ADAMTS13, se administró a los ratones una inyección intravenosa de ADAMTS13 recombinante (proporcionada amablemente por THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE; ADAMTS13W688X) antes de la isquemia y antes de la reperfusión (20 U/cuerpo, respectivamente), y luego se sacrificaron 2, 6 y 24 h después de la reperfusión. Los controles se trataron con PBS. Los ratones operados en forma simulada se sometieron al mismo procedimiento, pero sin oclusión vascular. Los ratones se asignaron a los siguientes tres grupos.

Grupo 1: ratones de tipo silvestre + PBS

Grupo 2: ratones con inactivación + PBS

Grupo 3: ratones con inactivación + ADAMTS13 recombinante

No se observaron diferencias en la sangre periférica y las transaminasas en suero aparte de la actividad de ADAMTS13 entre ratones con inactivación y ratones de tipo silvestre.

Tabla 1

	ADAMTS13 +/+	ADAMTS13 -/-	
AST (IU/L)	60,0 ± 10,0	52,40 ± 2,20	ns
ALT (IU/L)	20,66 ± 5,66	27,60 ± 1,32	ns
Hb (g/dL)	16,05 ± 0,15	15,98 ± 0,47	ns
Hct (%)	54,10 ± 1,30	58,44 ± 2,22	ns
Plt (×10 ⁴ /ul)	67,90 ± 4,0	69,94 ± 6,86	ns
ADAMTS13 (%)	92,50 ± 2,5	3,46 ± 0,91	p < 0,0001
PT (seg)	0,766 ± 0,004	0,786 ± 0,007	ns
APTT (seg)	23,80 ± 0,764	22,86 ± 0,898	ns
PT (INR)	0,766 ± 0,004	0,786 ± 0,007	ns

Enzimas hepáticas y recuento de plaquetas:

5 Los niveles en suero de aspartato aminotransferasa (sAST), alanina aminotransferasa (sALT) y lactato hidrogenasa (LDH) se midieron mediante un método espectrofotométrico estándar con un analizador clínico automático (JCA-BM9030, JEOL Ltd., Tokio, Japón). El recuento de plaquetas se cuantificó mediante el contador automático de células sanguíneas Becton Dickinson QBC II Plus 4452.

Histología:

10 Se tiñeron secciones de hígado incluidas en parafina (4 µm de espesor) con hematoxilina y eosina. La gravedad de la IRI hepática (necrosis, congestión sinusoidal y vacuolización) se calificó a ciegas con los criterios de Suzuki en una escala de 0 a 429.

15 Análisis cuantitativo de la microcirculación del hígado:

La microcirculación del hígado después de la reperusión se evaluó mediante medidor de flujo Doppler con láser (O2C: oxígeno para ver; LEA Medizintechnik GmbH, Giessen, Alemania). Se calculó el cambio relativo del flujo sanguíneo frente al valor preisquémico.

20 Medición de la actividad en plasma de ADAMTS13:

25 Se utilizó el método FRET5 VWF73. Brevemente, las muestras de plasma se diluyeron en el tampón de reacción (bis-Tris 5 mM, CaCl₂ 25 mM y Tween-20 al 0,05% a pH 6,0), luego se añadieron solución de sustrato de FRET5-VWF73 4 µM (PEPTIDE INSTITUTE, INC., Osaka, Japón) y 10 µl de cóctel inhibidor de proteasa (P8340, Sigma-Aldrich Inc., St Louis, EE.UU.). Después de la incubación, se midió la intensidad de la fluorescencia emitida usando plasma de ratones de tipo silvestre sin tratamiento como estándar mediante un espectrofotómetro de fluorescencia (Fluoroskan Ascent FL, Thermo LabSystems, Helsinki, Finlandia) con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm.

30 Inmunofluorescencia para CD42b:

35 Después de la desparafinización de las secciones de hígado, se recuperó el antígeno mediante tampón de citrato (10 mM, pH 6,0). Después de bloquear con bloqueador de proteína sin suero (X0909, DAKO, Tokio, Japón) durante 30 minutos, las secciones se incubaron con CD42b primario de conejo antirratón (bs-2347R, Boston, Massachusetts) a una dilución 1:200 durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las secciones se hicieron reaccionar con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (H + L) conjugado con Alexa Fluor® 594. El área positiva de CD42b se cuantificó mediante un software de análisis (ImageJ, NIH, EE. UU.). Se prepararon portaobjetos de control negativo mediante la incubación con IgG de conejo normal (sc-2027, Santa Cruz, CA) en lugar del primer anticuerpo.

40 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real SYBR Green:

45 Se extrajo ARN total del tejido hepático usando el kit RNeasy (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y se preparó ADN complementario con el kit Omniscript RT (Qiagen). La PCR cuantitativa se realizó usando el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus^{MR} (Applied Biosystems®, Tokio, Japón) con mezcla maestra rápida SYBR® Green. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C (20 segundos), 95 °C (3 segundos), seguido de 45 ciclos de 95 °C (15 segundos), 60 °C (30 segundos). Las expresiones de genes diana se calcularon por sus proporciones con respecto al gen de mantenimiento GAPDH.

Análisis estadístico:

50 Todos los datos se expresan como medias ± SEM. Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza bidireccional seguido de la prueba posterior de Bonferroni o la prueba t de Student para datos no apareados. Todos los cálculos se realizaron utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Todas las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de p <0,05.

Resultados:

(1) La expresión de ADAMTS13 está subregulada en el hígado con IRI:

60 Se examinó la actividad de ADAMTS13 en plasma y la cuantificación del ARNm de ADAMTS13 en el hígado de ratones de tipo silvestre expuestos a isquemia por calor durante 90 minutos. La concentración de ADAMTS13 en plasma descendió hasta aproximadamente el 36% en una etapa temprana de reperusión en comparación con la condición fisiológica, luego se mantuvo un nivel tan bajo como la duración de hasta 24 horas después de la reperusión (Figuras 10 y 29). La expresión génica de la RT-PCR cuantificada de ADAMTS13 disminuyó desde el punto de tiempo de la isquemia, y luego se suprimió durante la IRI (Figuras 10 y 29). Estos resultados indicaron que la producción de ADAMTS13 a partir de HSC era susceptible a la isquemia y las HSC eran vulnerables a la IRI hepática.

(2) La deficiencia de ADAMTS13 agrava el daño hepático y la trombocitopenia:

La función hepática se analizó en el modelo de isquemia hepática parcial por calor de 90 min seguida de reperfusión. El daño debido a la IR se agravó profundamente en los ratones ADAMTS13 ^{-/-}, en comparación con los de tipo silvestre. Como se muestra en las Figuras 10, 11 y 29, la sAST a las 24 horas, la sALT a las 6 horas y los niveles de LDH tanto a las 6 como a las 24 horas después de la reperfusión aumentaron significativamente. De acuerdo con el daño hepático, el recuento de plaquetas en sangre periférica disminuyó después de la reperfusión en ratones ADAMTS13 ^{-/-} (Figs. 10 y 29).

(3) La suplementación de ADAMTS13 mejora el daño tisular inducido por IR y el recuento de plaquetas:

Para dilucidar la función de ADAMTS13 durante la IR hepática, se administró ADAMTS13 recombinante por vía intravenosa en ratones con inactivación antes del ataque de isquemia y justo antes de la reperfusión. Como se muestra en las Figs. 11, 12 y 32, los niveles de sAST, sALT y LDH tanto a las 6 como a las 24 horas en ratones con inactivación tratados con ADAMTS13 recombinante disminuyeron notablemente después de la reperfusión en comparación con los ratones con inactivación sin tratamiento con ADAMTS13 recombinante. Por tanto, el tratamiento con ADAMTS13 mejoró el daño hepatocelular fulminante en ratones con inactivación. En los hallazgos histológicos mostrados en las Figs. 13 y 33, los hígados de los ratones con inactivación tratados con PBS mostraron edema lobular severo, congestión, abombamiento y necrosis. Por el contrario, los daños hepáticos deteriorados en ratones con inactivación mejoraron significativamente tanto a las 6 como a las 24 horas después de la reperfusión mediante la suplementación de la ADAMTS13 recombinante. En consonancia con las enzimas hepáticas, el recuento de plaquetas en sangre periférica también mejoró profundamente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante tanto a las 6 como a las 24 horas en ratones en comparación con ratones sin tratamiento con ADAMTS13 recombinante.

(4) Agregación plaquetaria dentro del espacio sinusoidal:

La tinción con CD42b del hígado reveló que los ratones con inactivación tratados con vehículo mostraron una agregación masiva de plaquetas en el espacio sinusoidal en comparación con los ratones de tipo silvestre. Como se muestra en las Figuras 15, 16, 30 y 31, el área positiva para CD42b se redujo significativamente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante en ratones con inactivación. El área positiva para CD42b se incrementó junto con la disminución del recuento de plaquetas de la sangre periférica, lo que indica que se produjo agregación plaquetaria en el hígado durante la IRI.

(5) ADAMTS13 determina la regulación de la microcirculación hepática en una forma dependiente de la dosis hepática:

24 horas después de la reperfusión, el flujo sanguíneo hepático del hígado en ratones con inactivación sin tratamiento con ADAMTS13 recombinante se redujo significativamente hasta aproximadamente el 38% en comparación con los ratones de tipo silvestre. Por el contrario, la administración de ADAMTS13 recombinante mejoró significativamente la microcirculación intrahepática en ratones con inactivación a las 2 h. Estos datos se correlacionaron con la actividad plasmática de ADAMTS13, lo que implica que ADAMTS13 determina la gravedad de la IRI inducida por la alteración de la microcirculación.

(6) La participación de ADAMTS13 suprime las citocinas inflamatorias y el programa de quimiocinas:

Se investigaron los efectos de la deficiencia de ADAMTS13 y el tratamiento con ADAMTS13 recombinante sobre la expresión de citocinas y quimiocinas en tejidos hepáticos 6 y 24 horas después de la reperfusión. Las citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y el ligando de quimiocina (CXCL-2) se midieron mediante RT-PCR cuantitativa (Figuras 17, 18 y 35). Seis horas después de la reperfusión, la deficiencia de ADAMTS13 aumentó profundamente la expresión de IL-1 β e IL-6 en comparación con los ratones de tipo silvestre. Por el contrario, el tratamiento con ADAMTS13 redujo significativamente la liberación de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y CXCL-2 a las 6 h en ratones con inactivación. Estos resultados indicaron que ADAMTS13 poseía un potente efecto antiinflamatorio sobre la IRI hepática.

[Ejemplo 9]

<Papel de ADAMTS13 en la lesión por isquemia/reperfusión hepática: investigación de si el gen de ADAMTS13 recombinante puede ejercer un efecto protector en ratones de tipo silvestre en lugar de ratones deficientes en ADAMTS13>

Usando los mismos procedimientos que en el Ejemplo 8, se investigó si el efecto protector de la lesión por reperfusión/isquemia hepática se puede observar mediante la administración de ADAMTS13 recombinante a ratones de tipo silvestre (Figura 19). Los ratones se dividieron en los dos grupos siguientes.

Grupo 1: ratones de tipo silvestre + PBS

Grupo 2: ratones de tipo silvestre + ADAMTS13 recombinante

<Tanto el marcado aumento de la actividad de FvW como la marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 se producen por isquemia/reperfusión hepática>

5 En los dos grupos descritos anteriormente, el tejido hepático se recogió antes de la isquemia hepática y la reperfusión (pre), al final de la isquemia (inmediatamente antes de la reperfusión: 0 h), 2 horas después de la reperfusión (2 h), 6 horas después de la reperfusión (6 h) y 24 h después de la reperfusión (24 h), y se cuantificó la expresión génica de FvW y ADAMTS13 mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados se muestran como una relación relativa al gen de mantenimiento GAPDH.

10 Como resultado, se encontró que tanto un marcado aumento de la actividad de FvW como una marcada disminución de la actividad de ADAMTS13 se producían en la lesión por isquemia/reperfusión hepática (Figura 20). Por tanto, también en ratones de tipo silvestre (= adulto normal), el desequilibrio de FvW/ADAMTS13 fue significativo y, por tanto, se espera enormemente la importancia terapéutica de la suplementación con ADAMTS13.

15 (1) La expresión de ADAMTS13 se subreguló en el hígado con IRI:

Se realizó la cuantificación del ARNm de ADAMTS13 en el hígado de ratones de tipo silvestre expuestos a isquemia por calor durante 90 minutos. Como resultado, la expresión de ADAMTS13 al final de la isquemia cayó de 1/4 a 1/5 en comparación con antes de la isquemia y se mantuvo un nivel tan bajo con una duración de hasta 24 horas después de la reperfusión (Figura 20). Por tanto, se demostró que las células estrelladas hepáticas, que son células productoras de ADAMTS13, fueron dañadas por isquemia/reperfusión hepática y el valor de la actividad sistémica de ADAMTS13 disminuyó notablemente.

25 (2) La deficiencia de ADAMTS13 agravó el daño hepático y la trombocitopenia:

El exceso de expresión de FvW, que se convierte en un núcleo del trombo plaquetario, y la marcada disminución de ADAMTS13, que es un trombo plaquetario que escinde la enzima, disminuyó significativamente el recuento de plaquetas después de la IR. Esta disminución de plaquetas mejoró significativamente mediante la administración de rADAMTS13. Esto disminuyó significativamente la elevación de LDH por microangiopatía hepática (Figura 21). Al final resultó que, debido a la mejora de la microangiopatía, las enzimas de desviación hepática como AST y ALT fueron significativamente bajas en el grupo de administración de rADAMTS13 (Figura 22).

35 (3) En los hallazgos histológicos, los hígados de los ratones de tipo silvestre tratados con PBS mostraron edema lobular severo, congestión, abombamiento y necrosis. Por el contrario, los daños hepáticos deteriorados en ratones silvestres mejoraron significativamente tanto a las 6 como a las 24 horas después de la reperfusión mediante la suplementación de la ADAMTS13 recombinante. Consistente con las enzimas hepáticas, el recuento de plaquetas de la sangre periférica también mejoró profundamente mediante la administración de rADAMTS13 tanto a las 6 como a las 24 horas en ratones de tipo silvestre en comparación con ratones sin ADAMTS13 recombinante.

40 (4) Agregación plaquetaria dentro del espacio sinusoidal:

El área positiva de CD42b se redujo significativamente mediante la administración de ADAMTS13 recombinante en ratones de tipo silvestre. El área positiva para CD42b indicó que se produjo agregación plaquetaria en el hígado durante la IRI.

(5) ADAMTS13 determinó la regulación de la microcirculación hepática en forma dependiente de la dosis hepática:

La administración de ADAMTS13 recombinante mejoró significativamente la microcirculación intrahepática en ratones de tipo silvestre a las 2 h. Estos datos se correlacionaron con la actividad plasmática de ADAMTS13, lo que implica que ADAMTS13 determina la gravedad de la IRI inducida por la alteración de la microcirculación.

(6) La inclusión de ADAMTS13 suprimió el programa de quimiocinas y citocinas inflamatorias:

55 Se investigaron los efectos de la deficiencia de ADAMTS13 y el tratamiento con ADAMTS13 recombinante sobre la expresión de citocinas y quimiocinas en tejidos hepáticos 6 y 24 horas después de la reperfusión. Las citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y el ligando de quimiocinas (CXCL-2) se midieron mediante RT-PCR cuantitativa. El tratamiento con ADAMTS13 redujo significativamente la liberación de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y CXCL-2 a las 6 h en ratones de tipo silvestre. Estos resultados indicaron que ADAMTS13 poseía un potente efecto antiinflamatorio sobre la IRI hepática.

60 [Ejemplo 10]

<Papel de ADAMTS13 en el trasplante de hígado: investigación utilizando un modelo de trasplante parcial de hígado del 20% y efecto protector del gen de ADAMTS13 recombinante>

65

5 Dado que la actividad de ADAMTS13 producida por las células estrelladas disminuye notablemente por el almacenamiento en frío inevitable para el trasplante de hígado (Figura 1) y, cuanto menor es el tamaño del hígado trasplantado, menor es la actividad de ADAMTS13 en una etapa temprana después de la cirugía (Figs. 5 y 6), el desequilibrio de FvW/ADAMTS13 se observa en todos los casos después del trasplante hepático en mayor o menor medida (Figura 7) y es extremo en el caso de muerte precoz (Figura 8). Viendo esto, usando un modelo de trasplante de hígado parcial de rata, los presentes inventores investigaron el efecto protector cuando la ADAMTS13 recombinante se administra después de un trasplante de hígado de un donante vivo adulto. Como modelo animal que imita el trasplante de hígado de un donante vivo adulto, se preparó un modelo de injerto de hígado parcial de aloinjerto de rata del 20% utilizando ratas Lewis (macho, 250 a 300 g) y utilizando el lóbulo derecho más el lóbulo caudado solo como injerto de hígado.

10 La tasa de supervivencia al cuarto día después del trasplante de hígado fue del 100% y excelente en el muestreo de muestras, al mismo tiempo la supervivencia a los siete días fue del 60% y el efecto del efecto terapéutico sobre la supervivencia se pudo evaluar como un factor principal final (Figura 23). La administración de ADAMTS13 recombinante mejoró significativamente el daño de los hepatocitos después de un trasplante de hígado parcial del 20% (Figuras 24 y 43). Además, la administración de ADAMTS13 recombinante mejoró significativamente la microangiopatía trombótica (afecciones de MAT) (Figuras 25 y 41). Desde el punto de vista patológico, la normalidad del hígado trasplantado se mantuvo mediante la administración de la ADAMTS13 recombinante a un modelo de trasplante parcial de hígado del 20% (Figuras 26 y 44).

20 Aplicabilidad industrial

25 Se divulga en el presente documento, un nuevo uso de una longitud completa o su fragmento parcial de ADAMTS13. Al utilizar ADAMTS13, como se divulga como referencia, se hace posible diagnosticar de manera rápida y precisa el daño hepático agudo y crónico y proporcionar un agente para tratar eficazmente el daño hepático, la isquemia hepática/lesión por reperfusión, la disfunción hepática después de un trasplante de hígado y la insuficiencia hepática aguda/hepatitis fulminante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. ADAMTS13 recombinante o un mutante del mismo para uso en el tratamiento y/o protección de lesión por isquemia-reperusión hepática causada por isquemia-reperusión que comprende isquemia por calor, en el que
- (i) dicho mutante tiene una actividad enzimática para escindir el factor Von Willebrand (vWF), en el que los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de ADAMTS13 no están mutados;
- (ii) dicho mutante comprende la unidad mínima necesaria para ejercer la actividad ADAMTS13, en el que dicha unidad comprende el dominio metaloproteasa y el dominio espaciador de ADAMTS13; y/o
- 10 (iii) dicho mutante es la proteína ADAMTS13W688X que es ADAMTS13 que carece de la porción C-terminal, en el que dicha porción C-terminal varía desde el aminoácido en la posición 689 hasta el aminoácido en la posición 1427.
- 15 2. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo está comprendido dentro de una composición farmacéutica.
3. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo se usa en un paciente que tiene un nivel reducido de ADAMTS13 y/o una concentración sanguínea elevada de vWF.
- 20 4. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo se usa en un paciente que se prevé que desarrollará un multímero de vWF inusualmente grande (UL-VWF), por ejemplo debido a inflamación.
- 25 5. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias después de una lesión por isquemia-reperusión.
- 30 6. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo tiene un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperusión hepática.
- 35 7. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicha composición farmacéutica comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable tal como un vehículo, un excipiente, un diluyente, un agente estabilizante, un promotor de la permeación tisular, y/o un agente solubilizante.
- 40 8. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que dicha composición farmacéutica está formulada para administración intravenosa, o para administración por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebral e intramedular, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, vía de administración intraespinal, oral, tópica o inhalatoria.
- 45 9. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que dicha composición farmacéutica se administra sistémica o tópicamente.
- 50 10. El ADAMTS13 recombinante o mutante del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha administración sistémica comprende administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, nasal, sublingual o rectal, y/o en el que dicha administración tópica comprende administración tópica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

Fig. 1

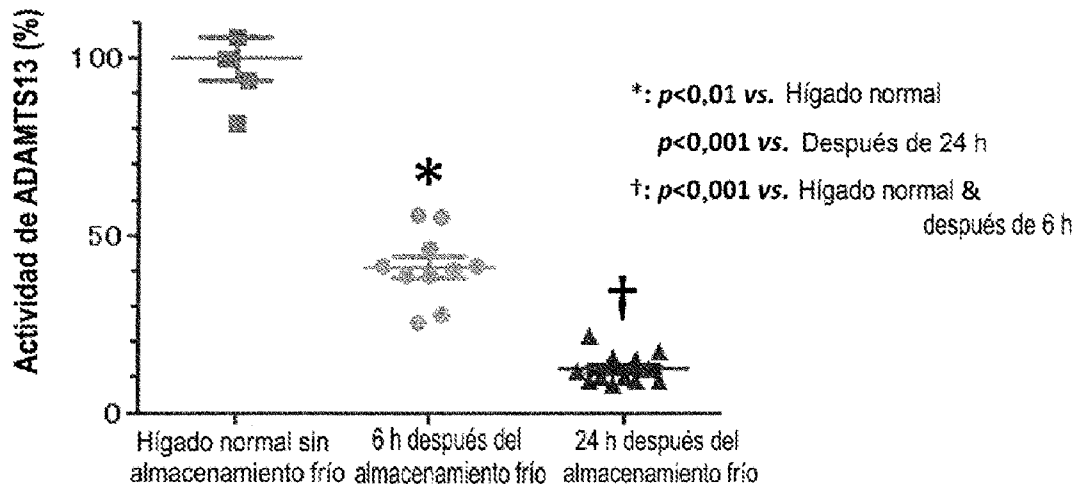


Fig. 2

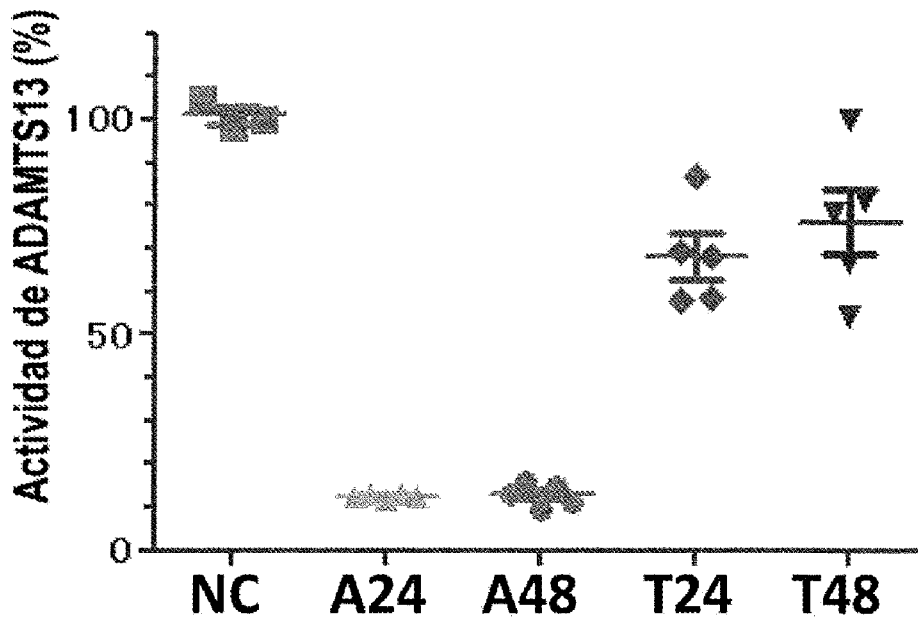


Fig. 3

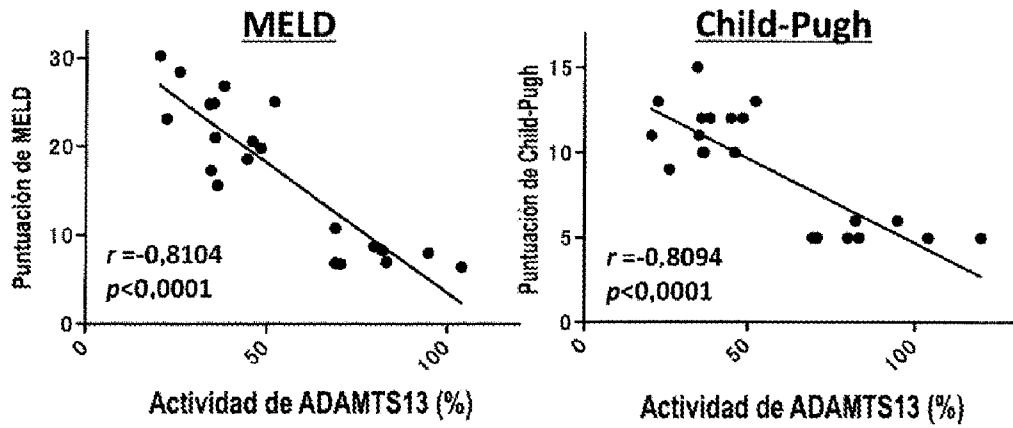


Fig. 4

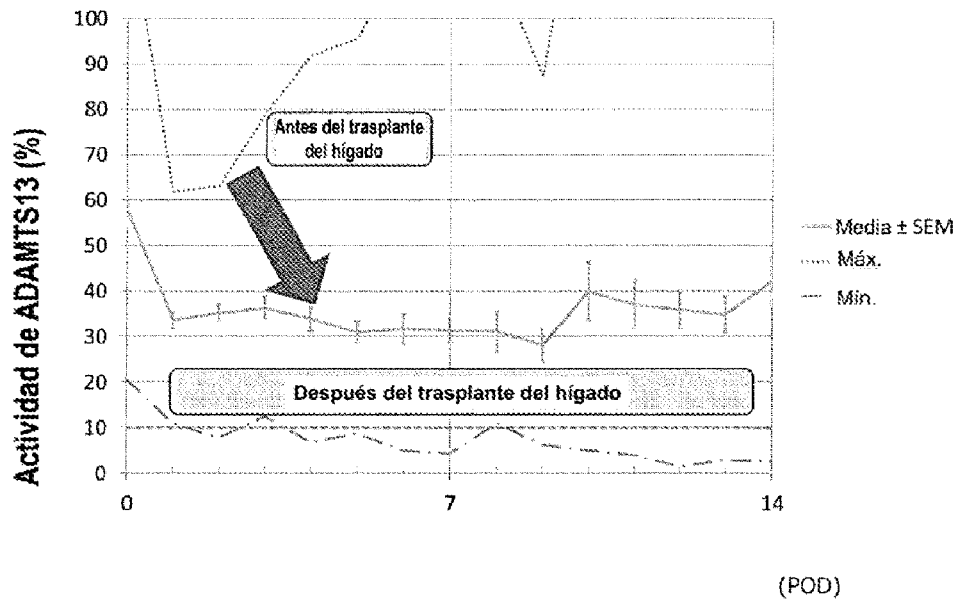


Fig. 5

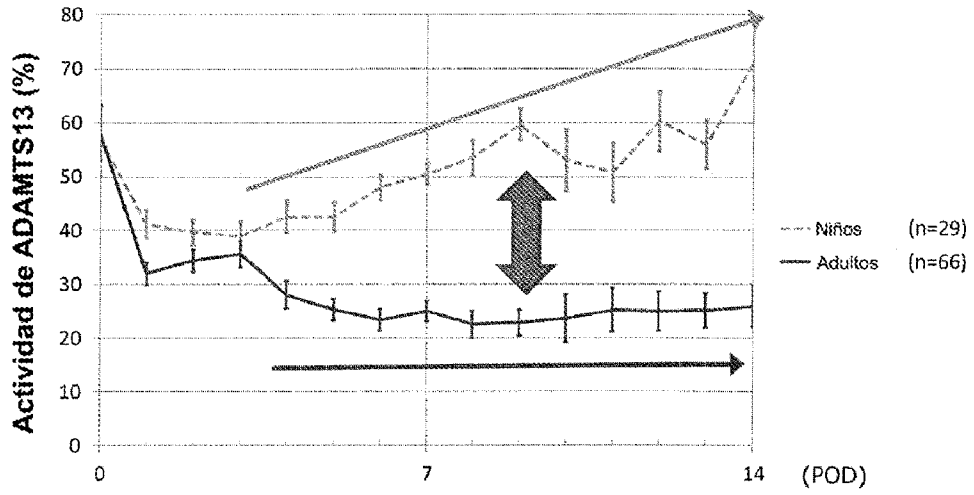


Fig. 6

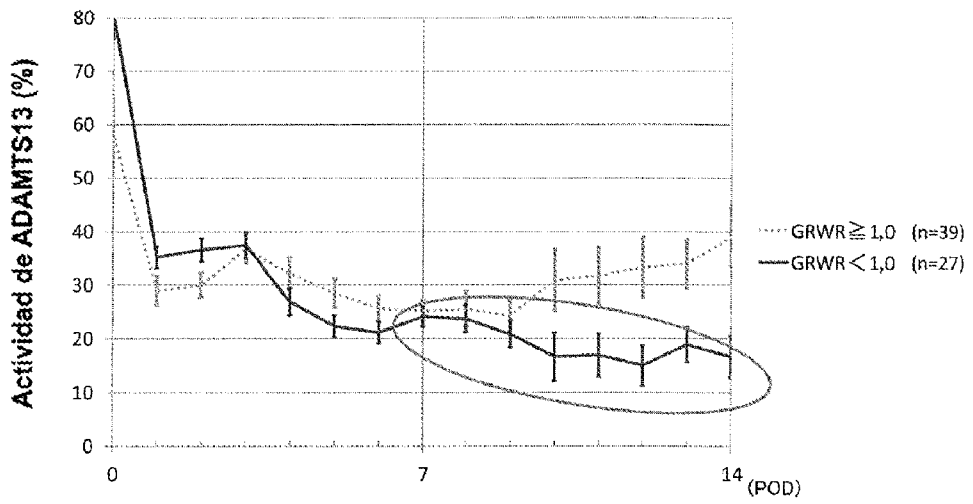


Fig. 7

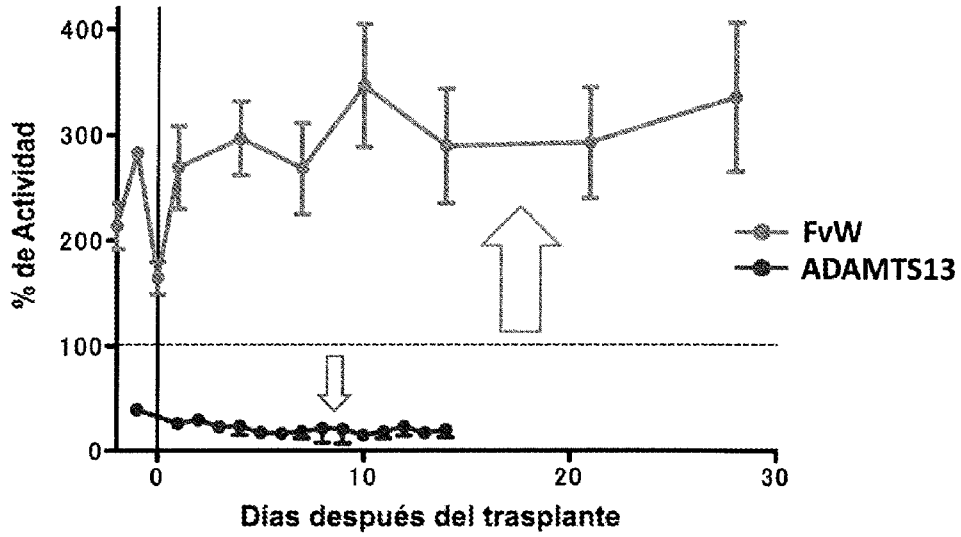


Fig. 8

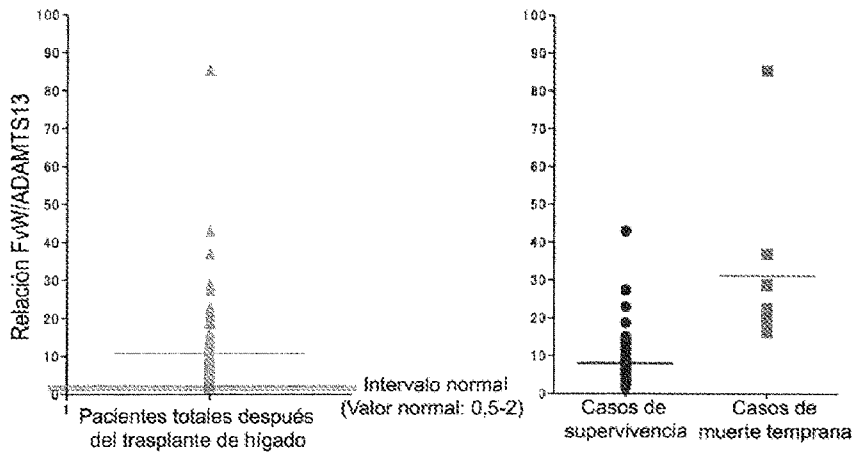


Fig. 9

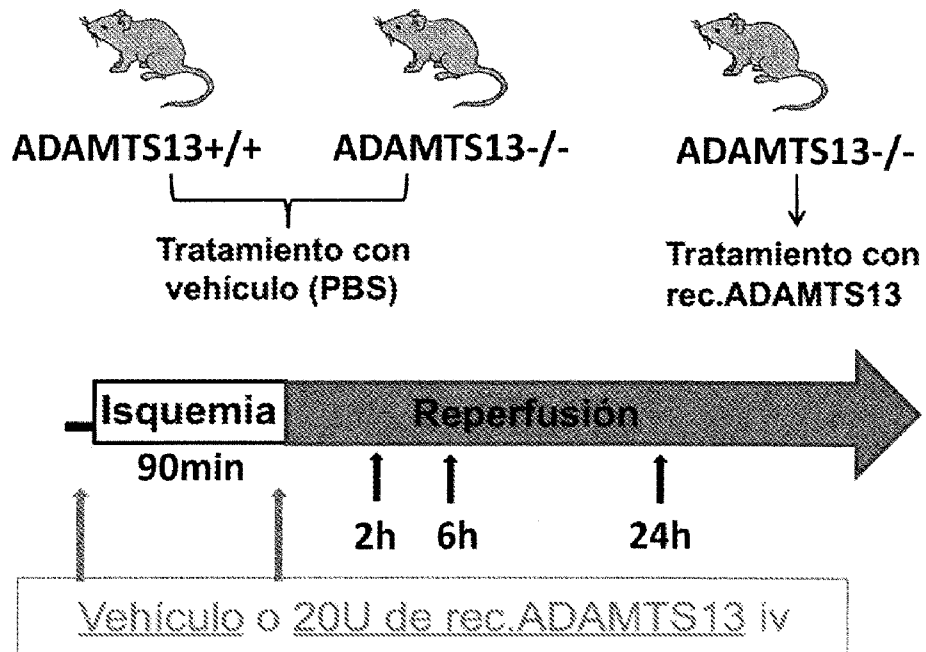


Fig. 10

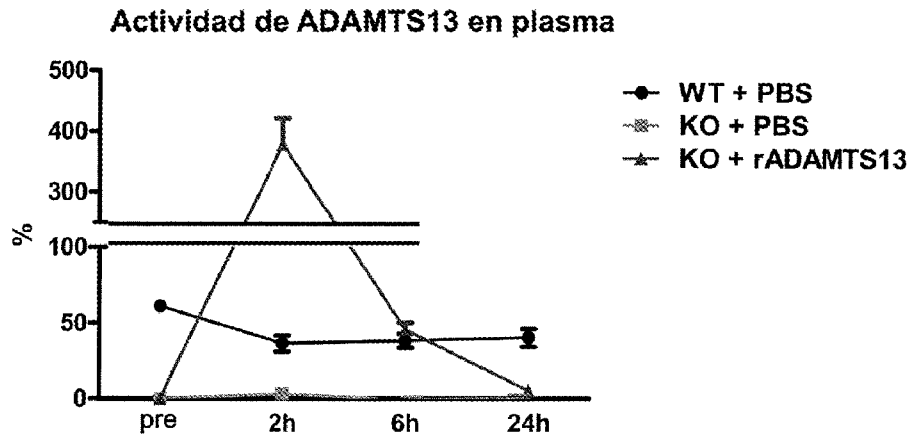


Fig. 11

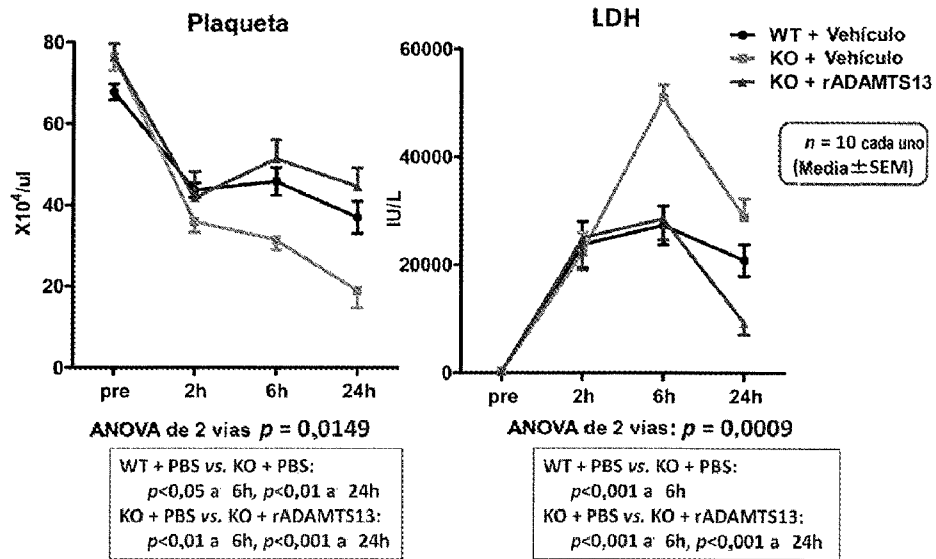


Fig. 12

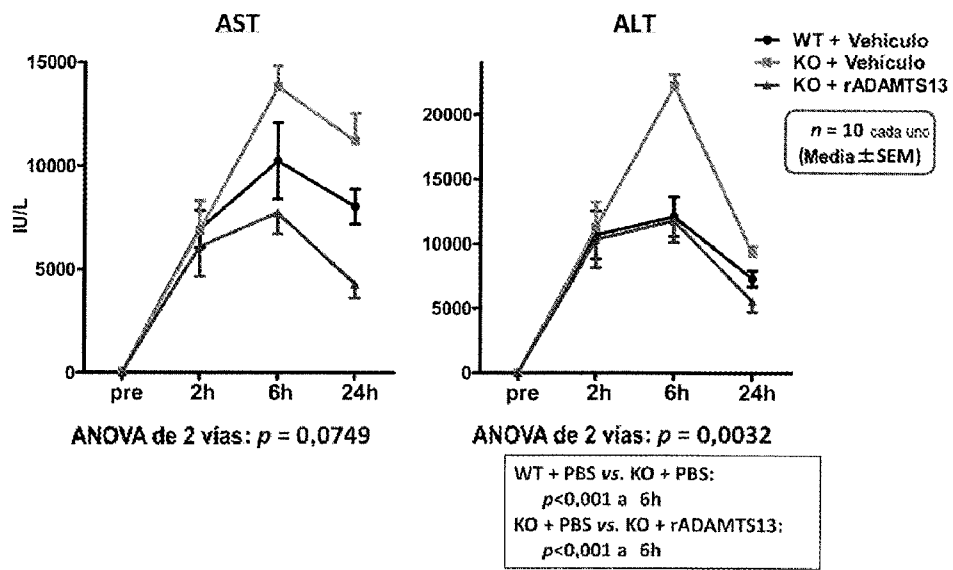


Fig. 13

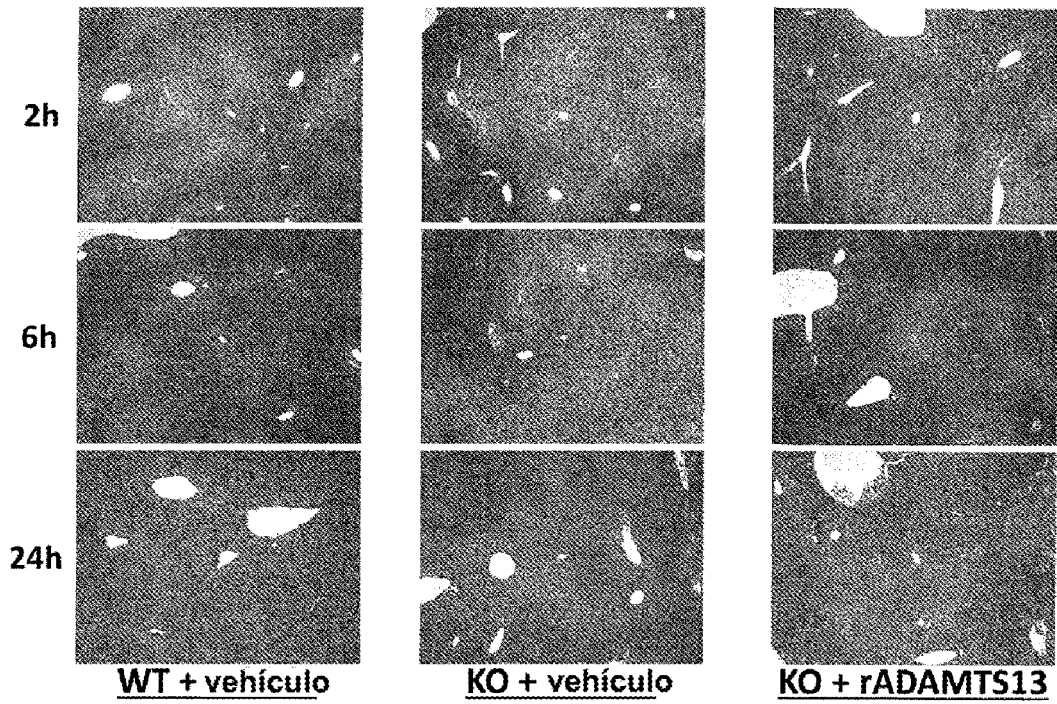


Fig. 14

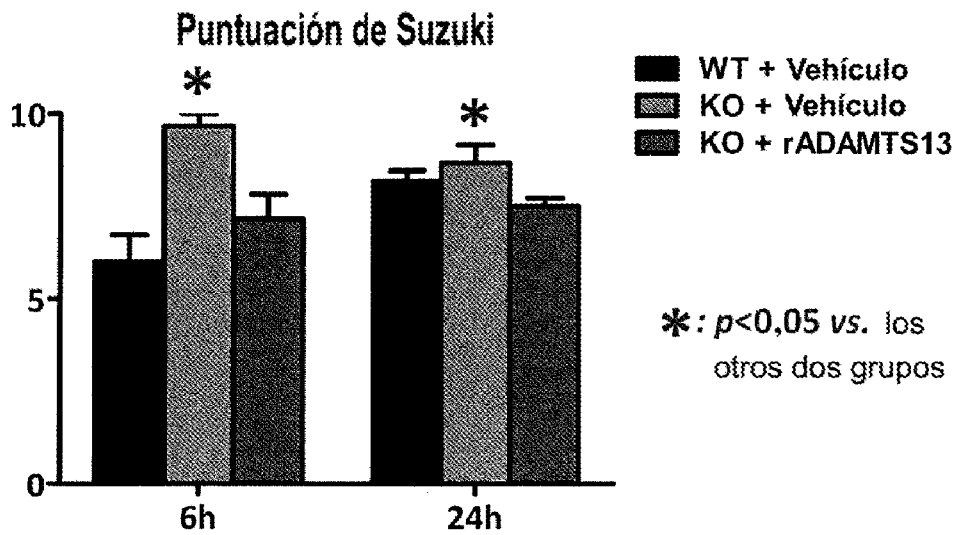


Fig. 15

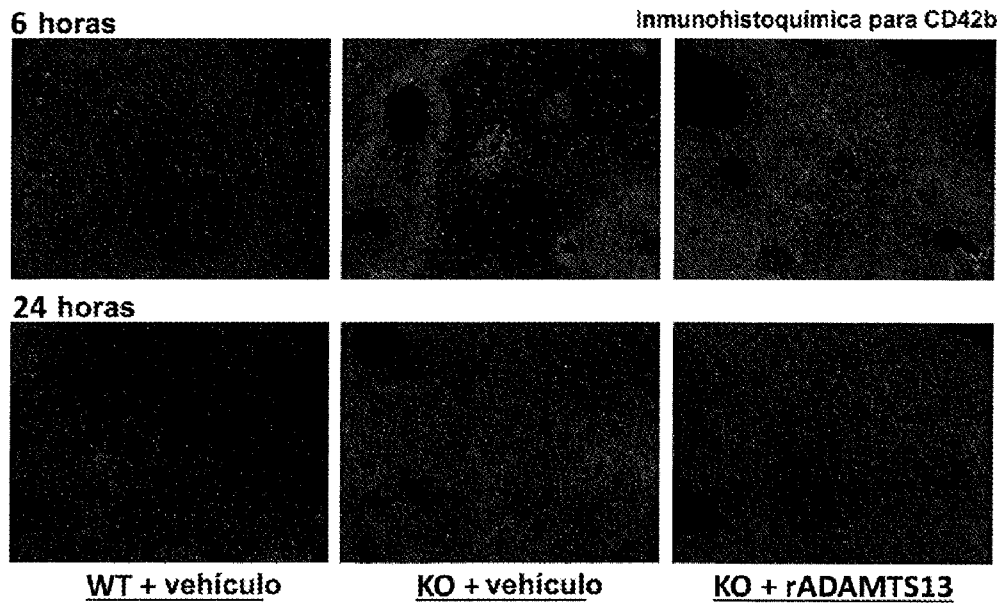


Fig. 16

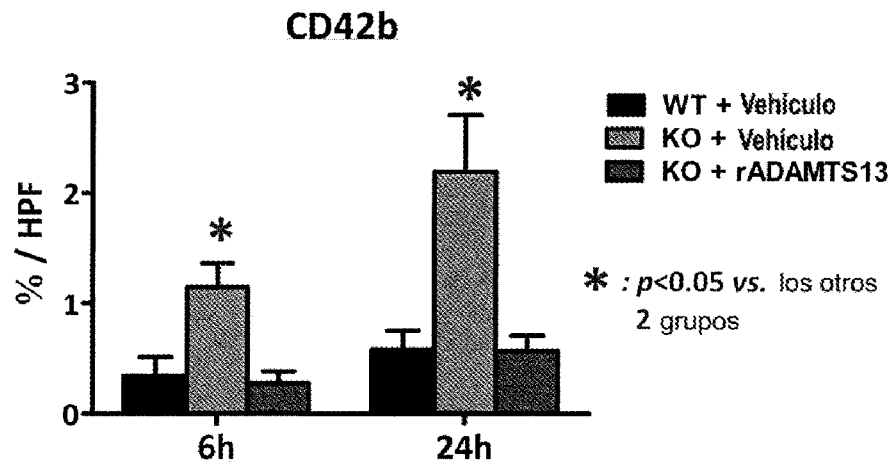


Fig. 17

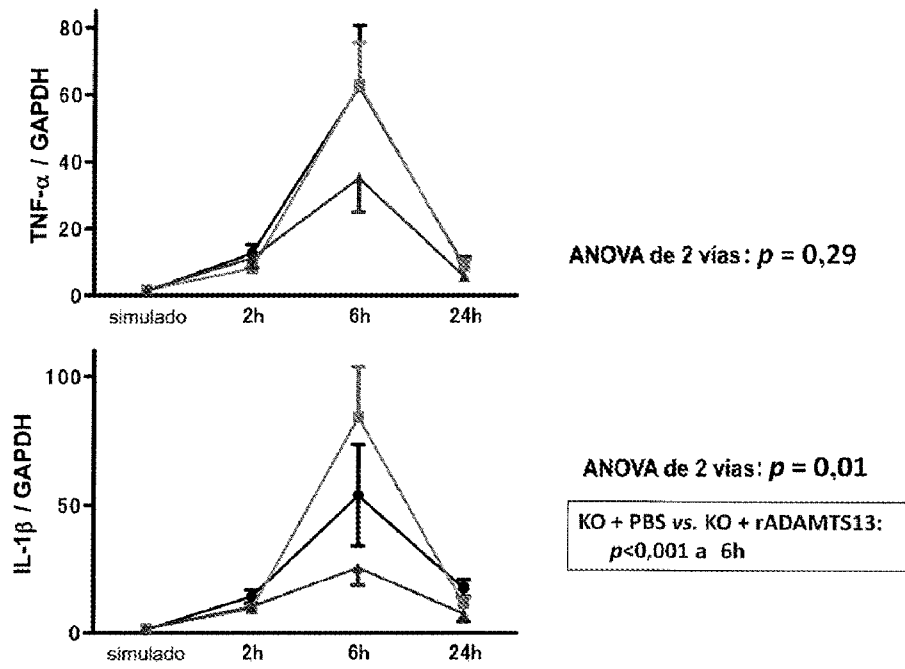


Fig. 18

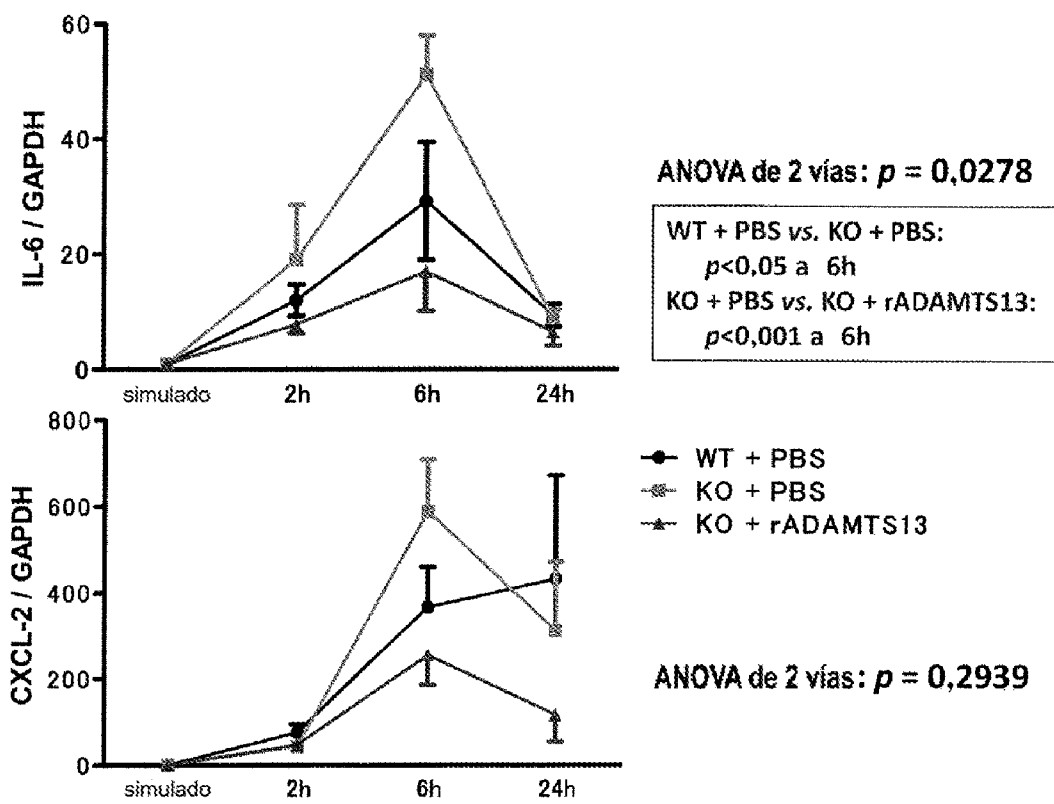


Fig. 19

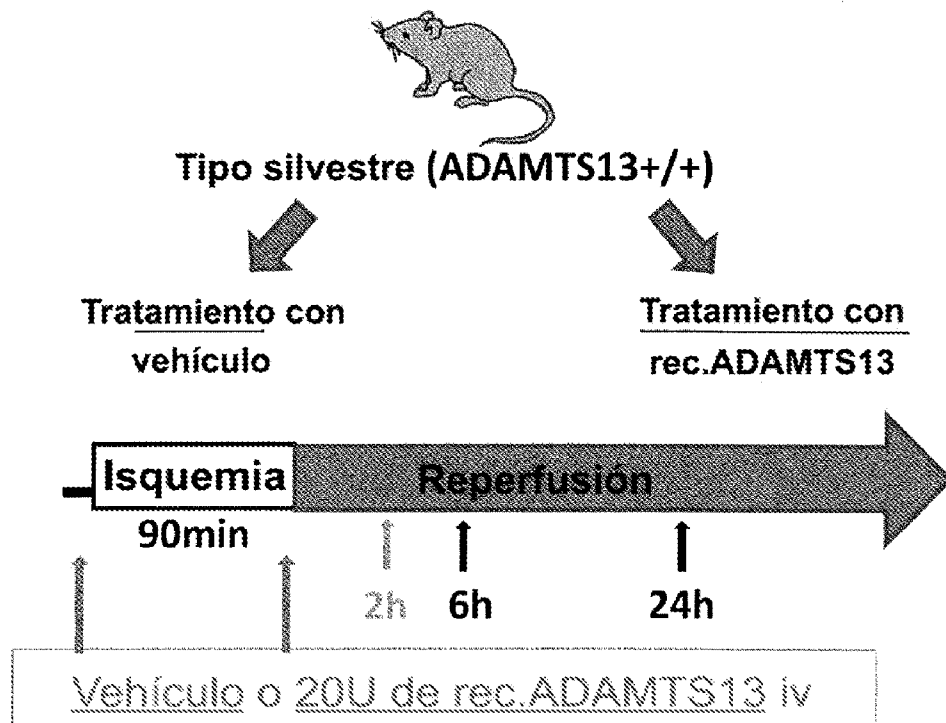


Fig. 20

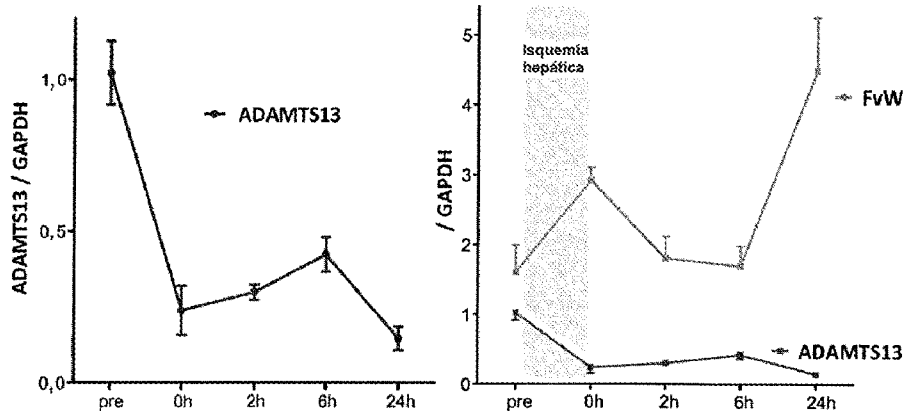


Fig. 21

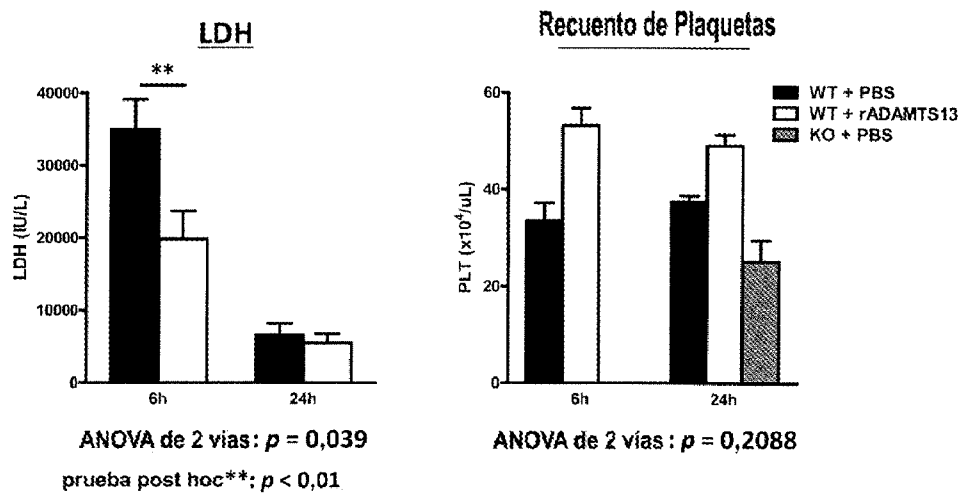


Fig. 22

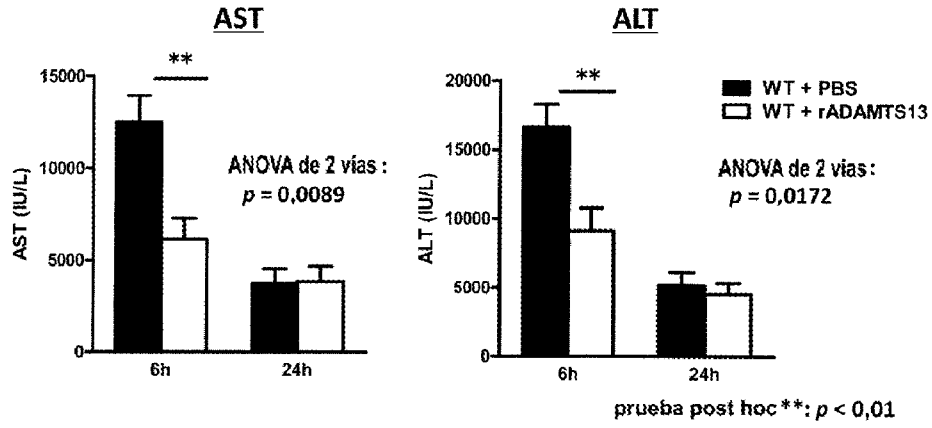


Fig. 23

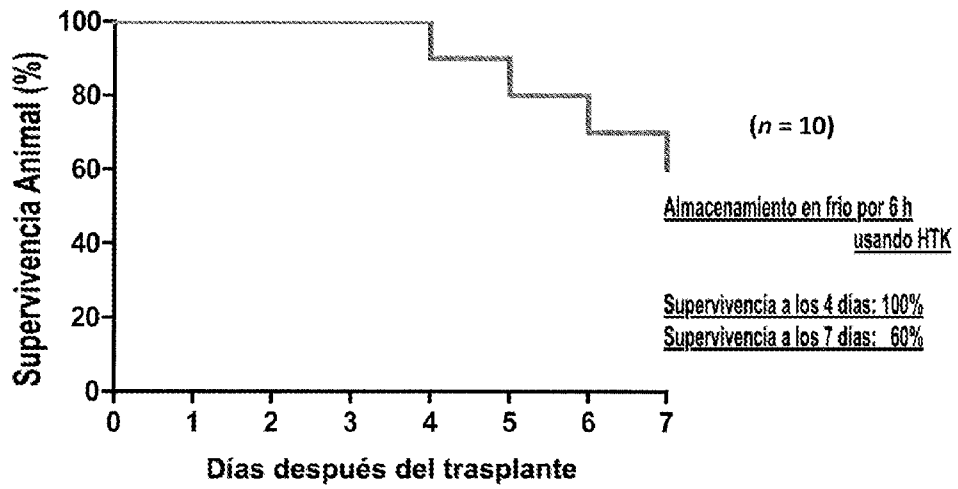


Fig. 24

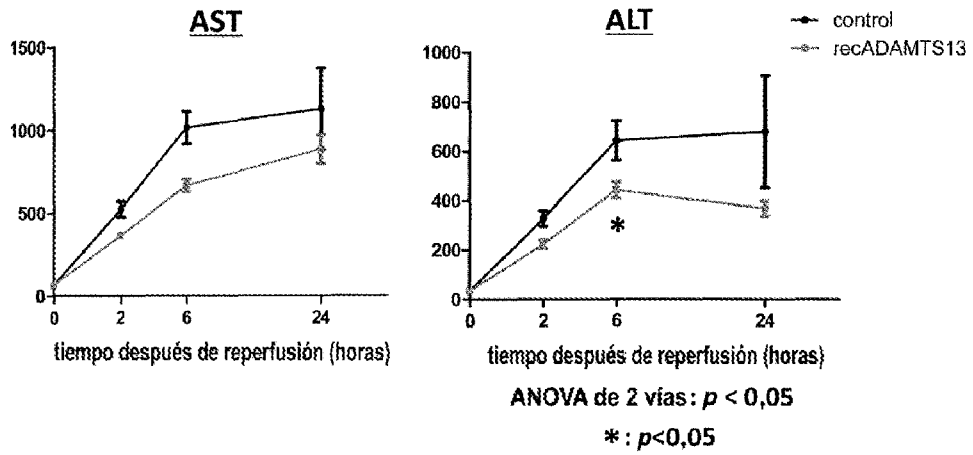


Fig. 25

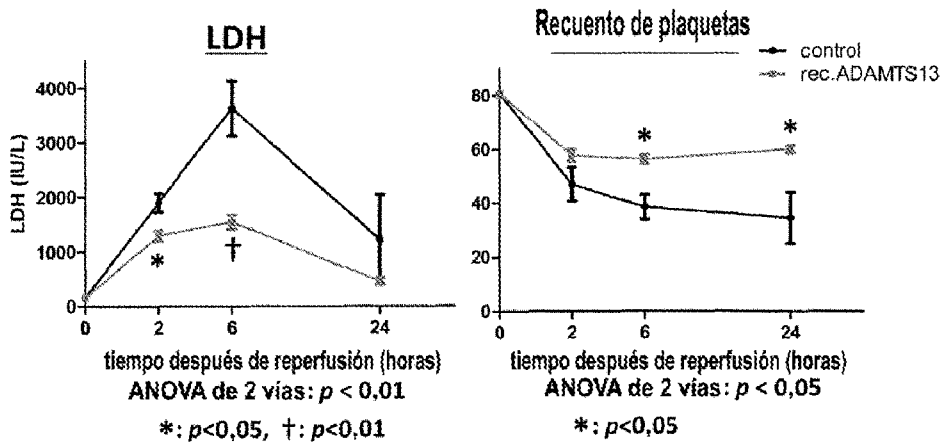


Fig. 26

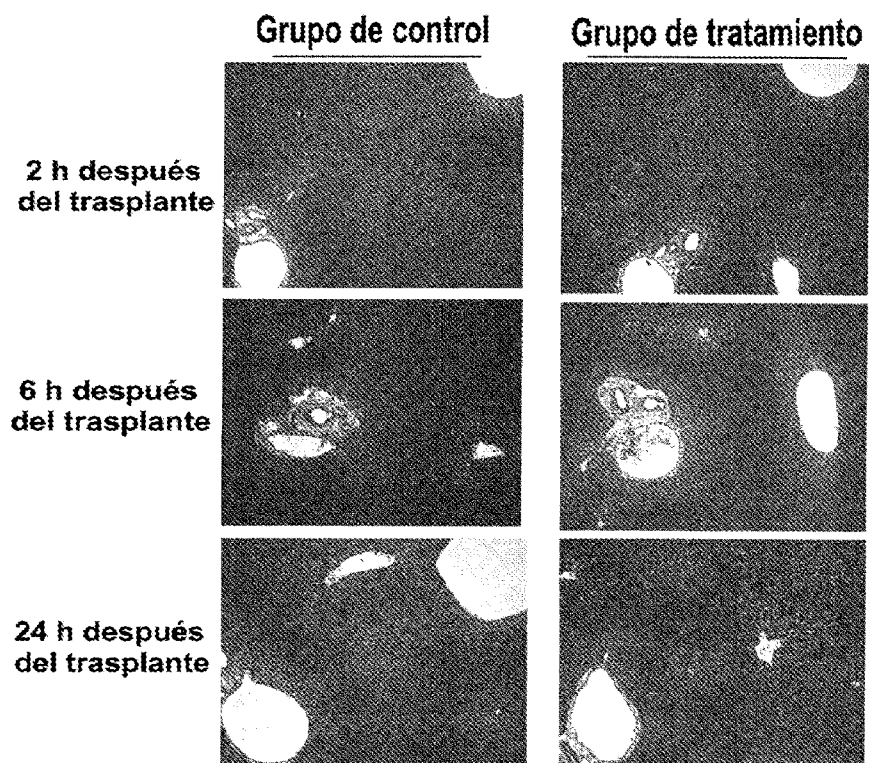


Fig. 27

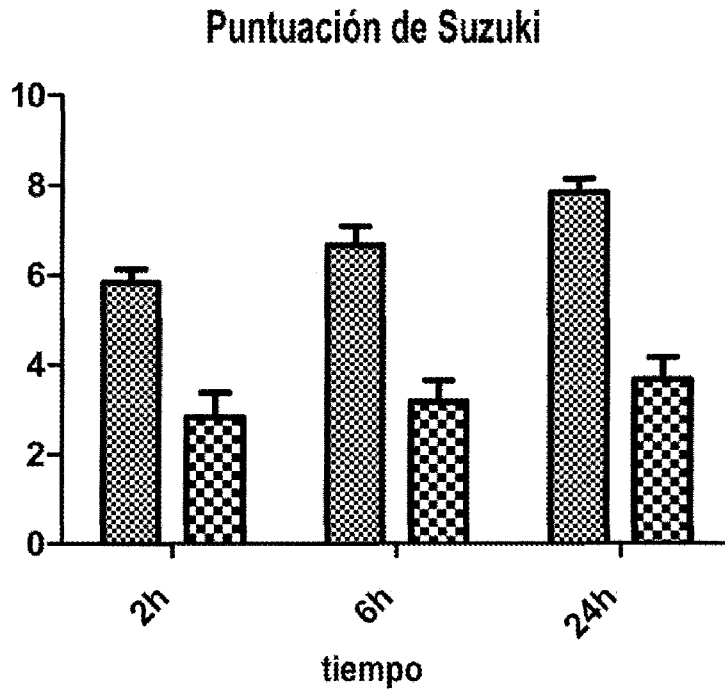


Fig. 28

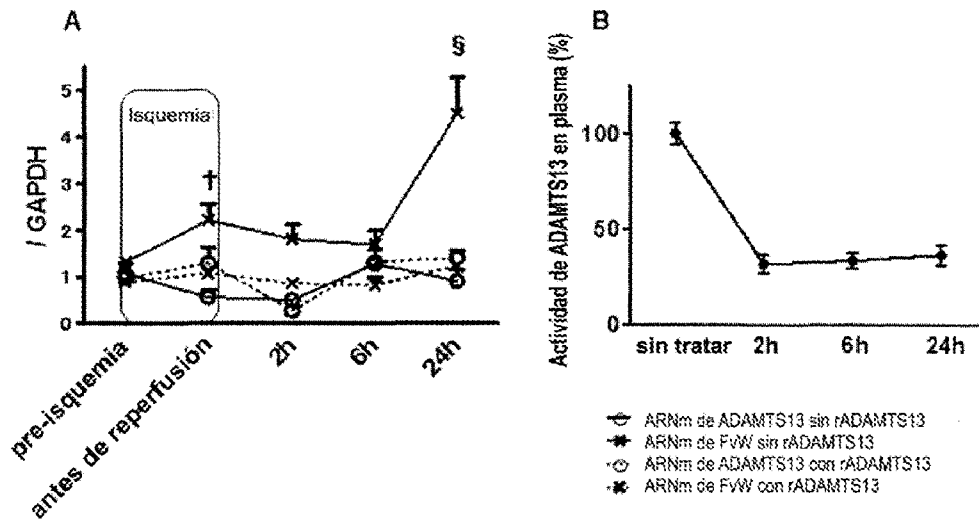


Fig. 29

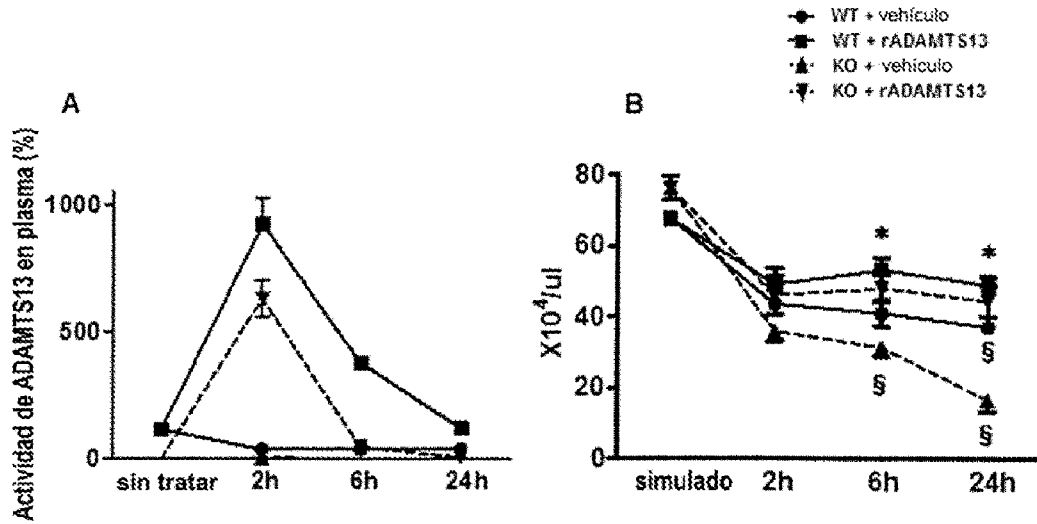


Fig. 30

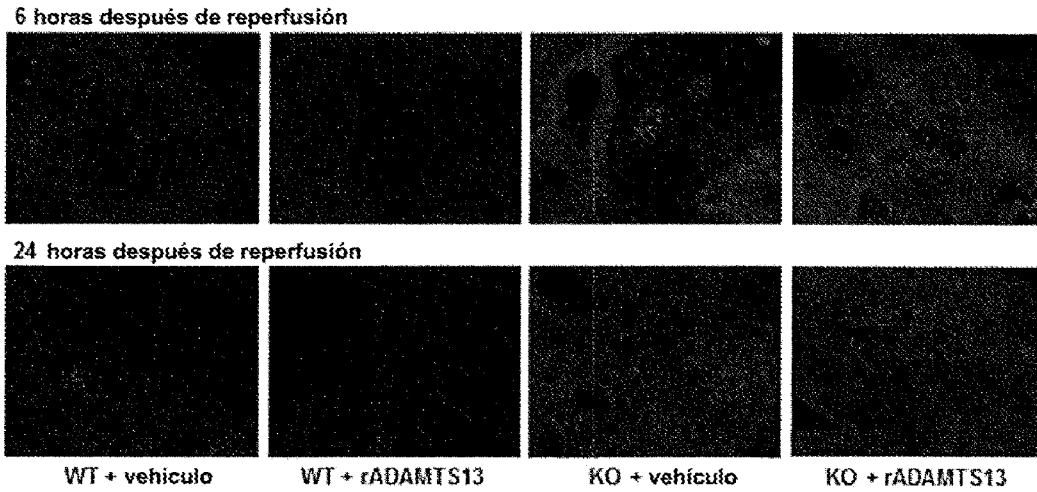


Fig. 31

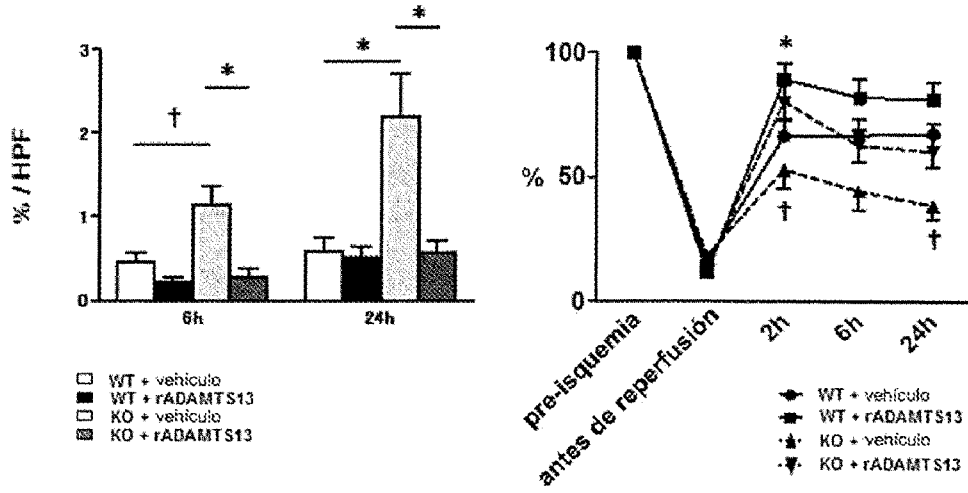


Fig. 32

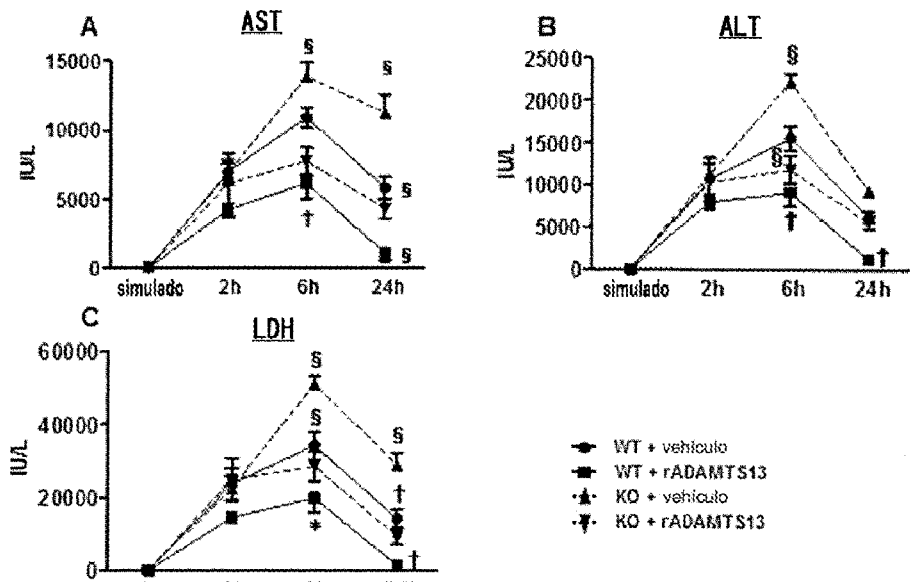


Fig. 33

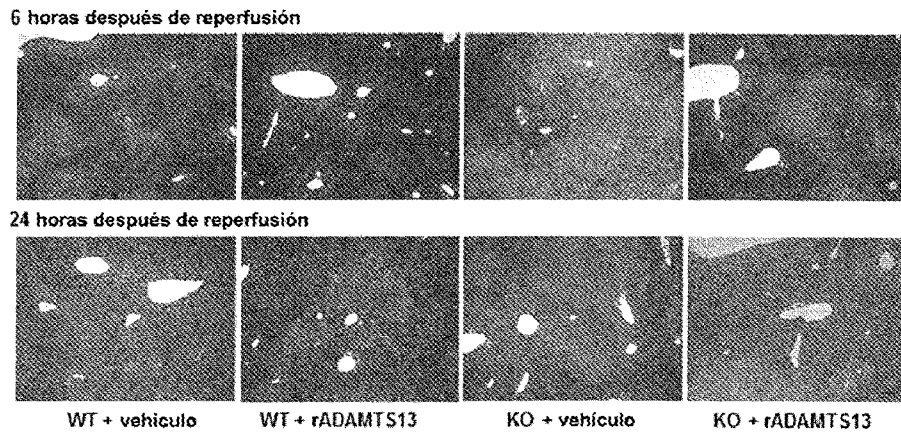


Fig. 34

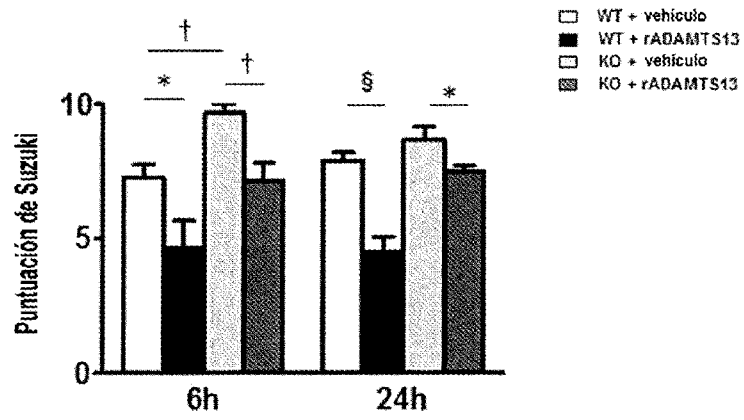


Fig.35

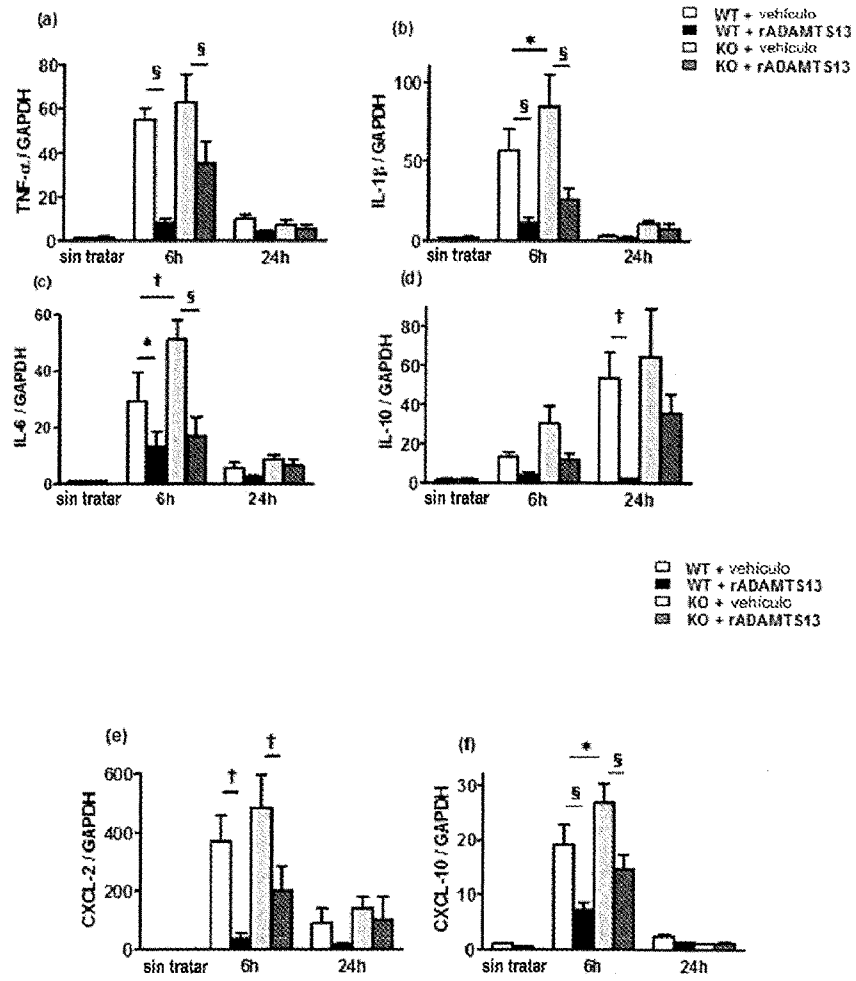


Fig. 36

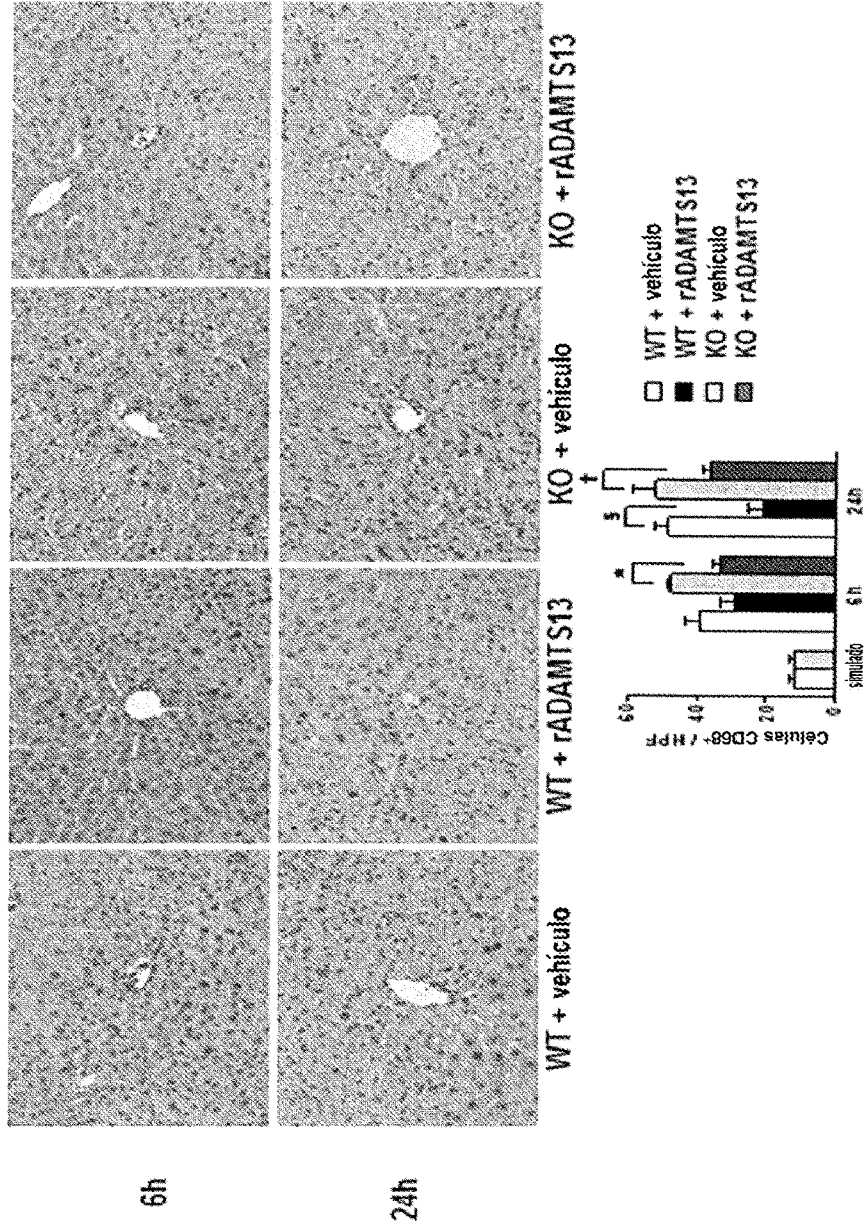


Fig. 37

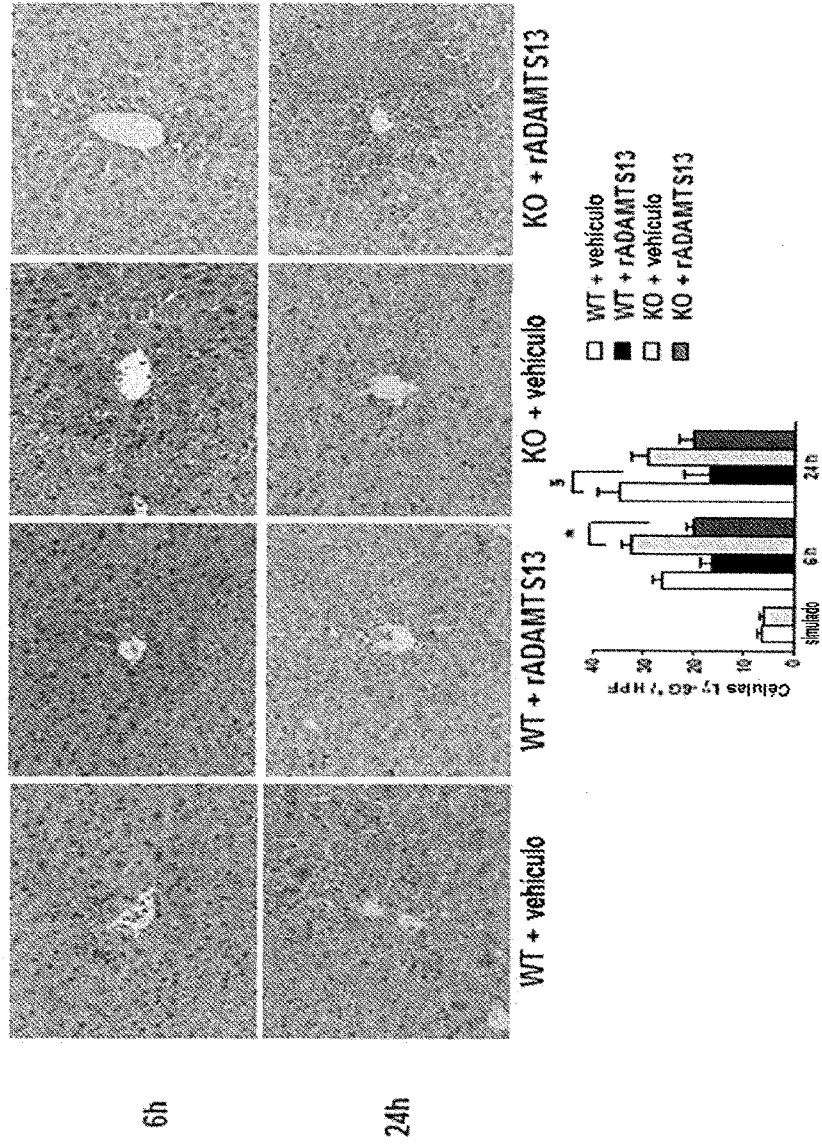


Fig. 38

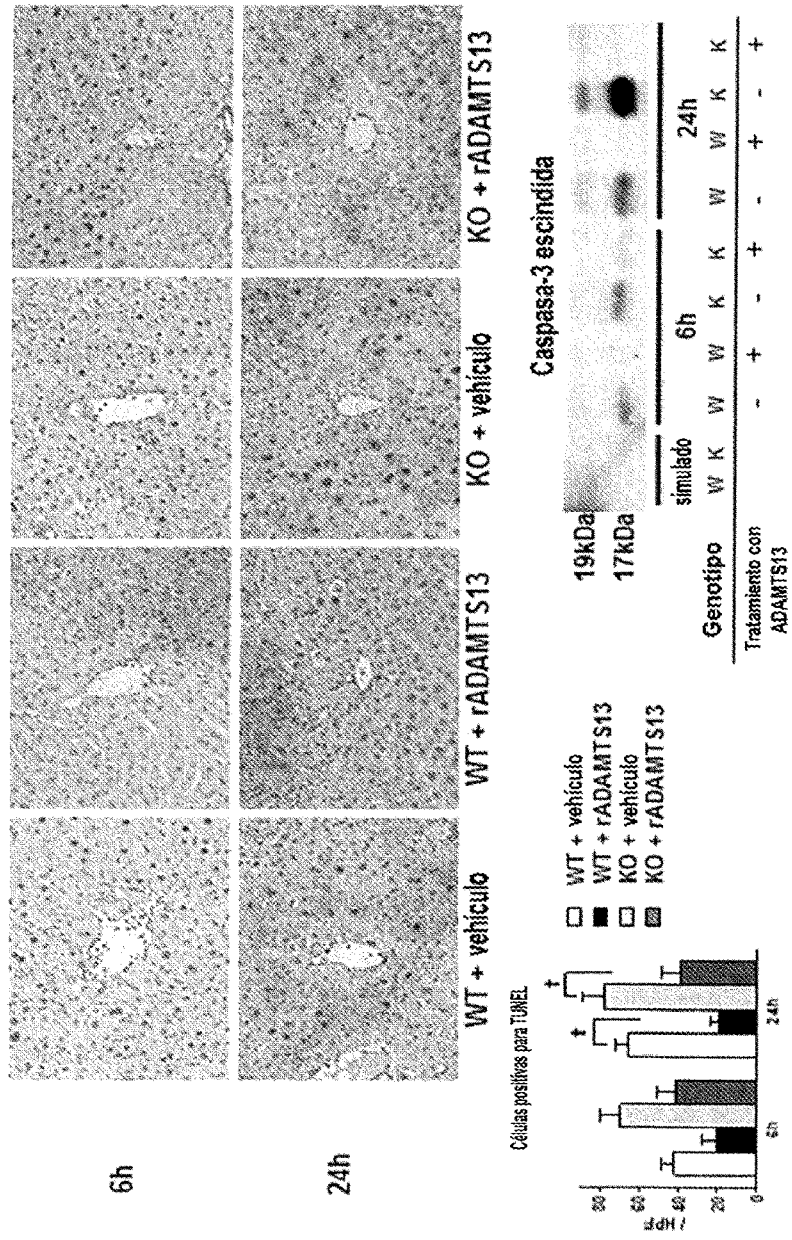


Fig. 39

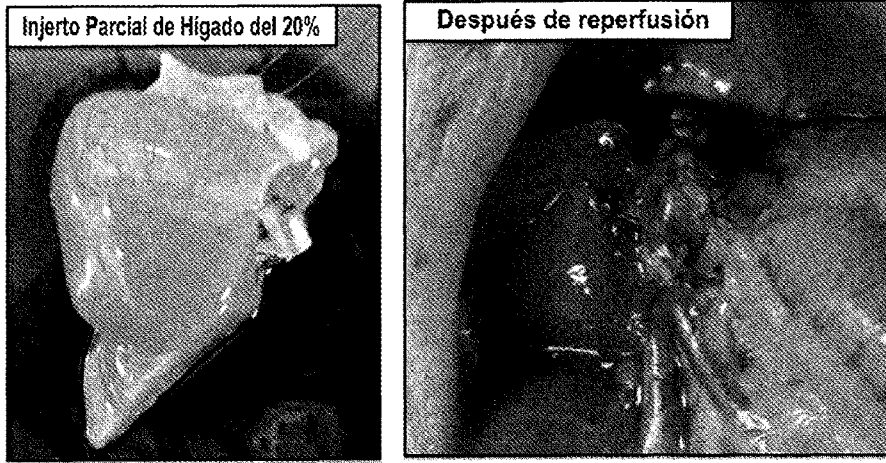


Fig. 40

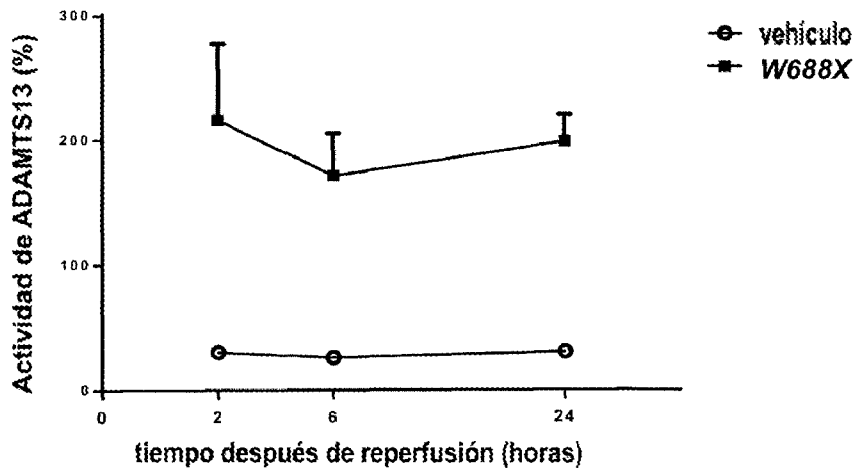


Fig. 41

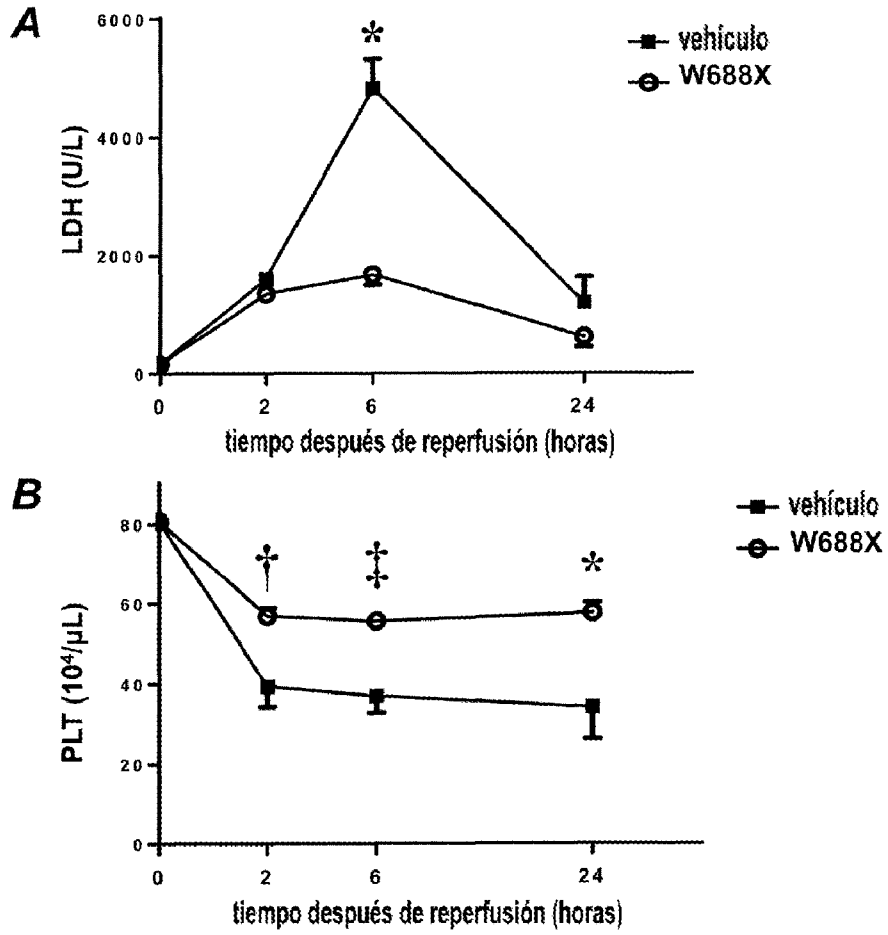


Fig. 42

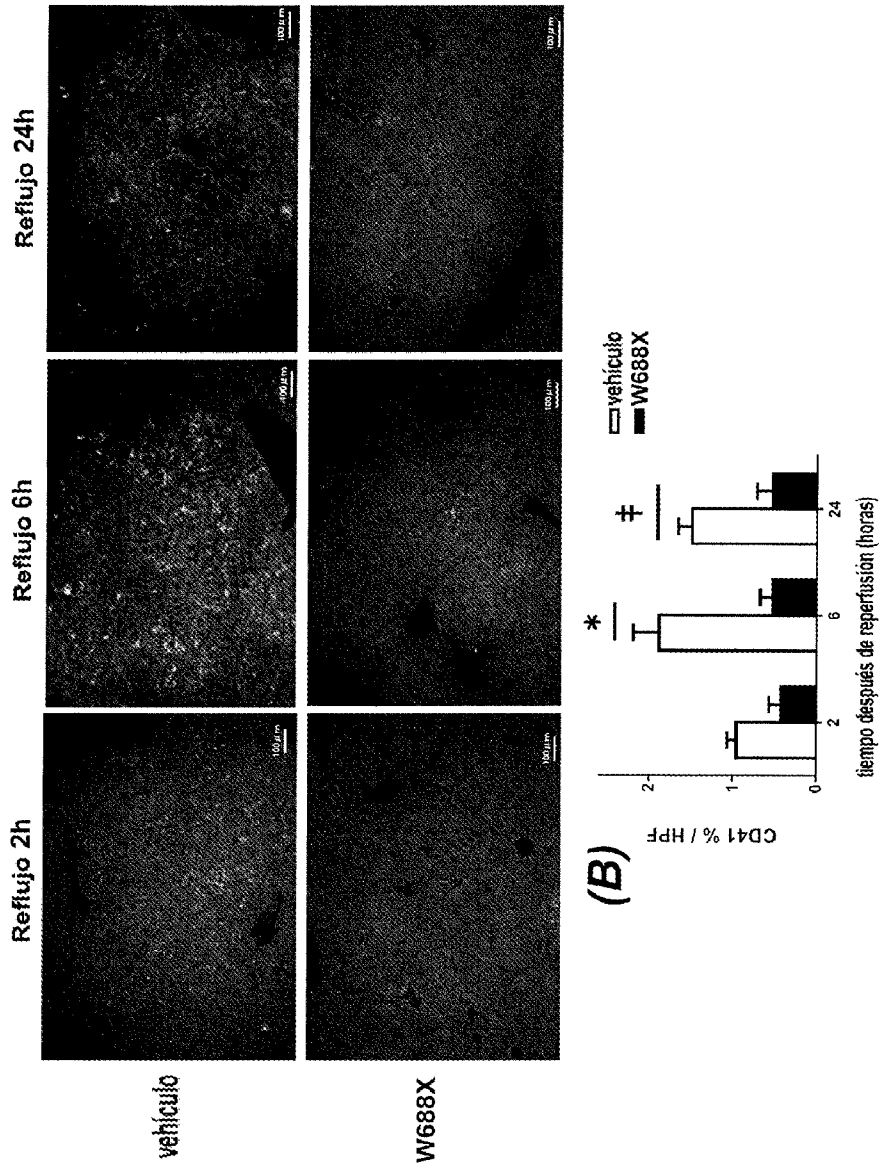


Fig. 43

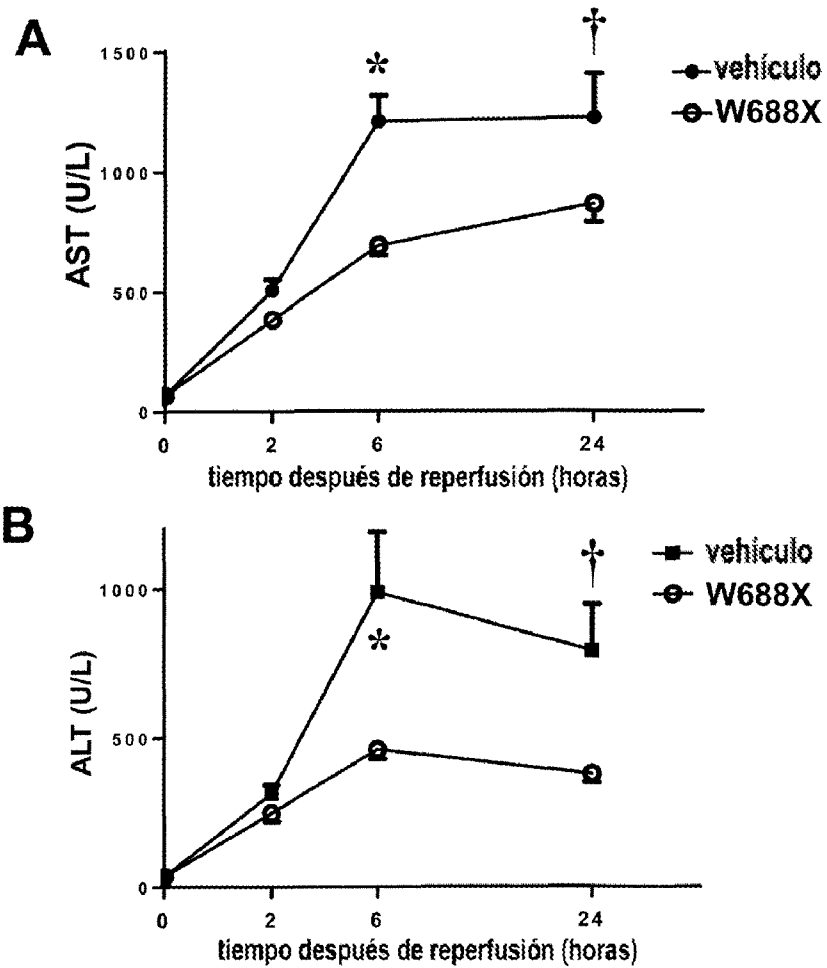


Fig. 44

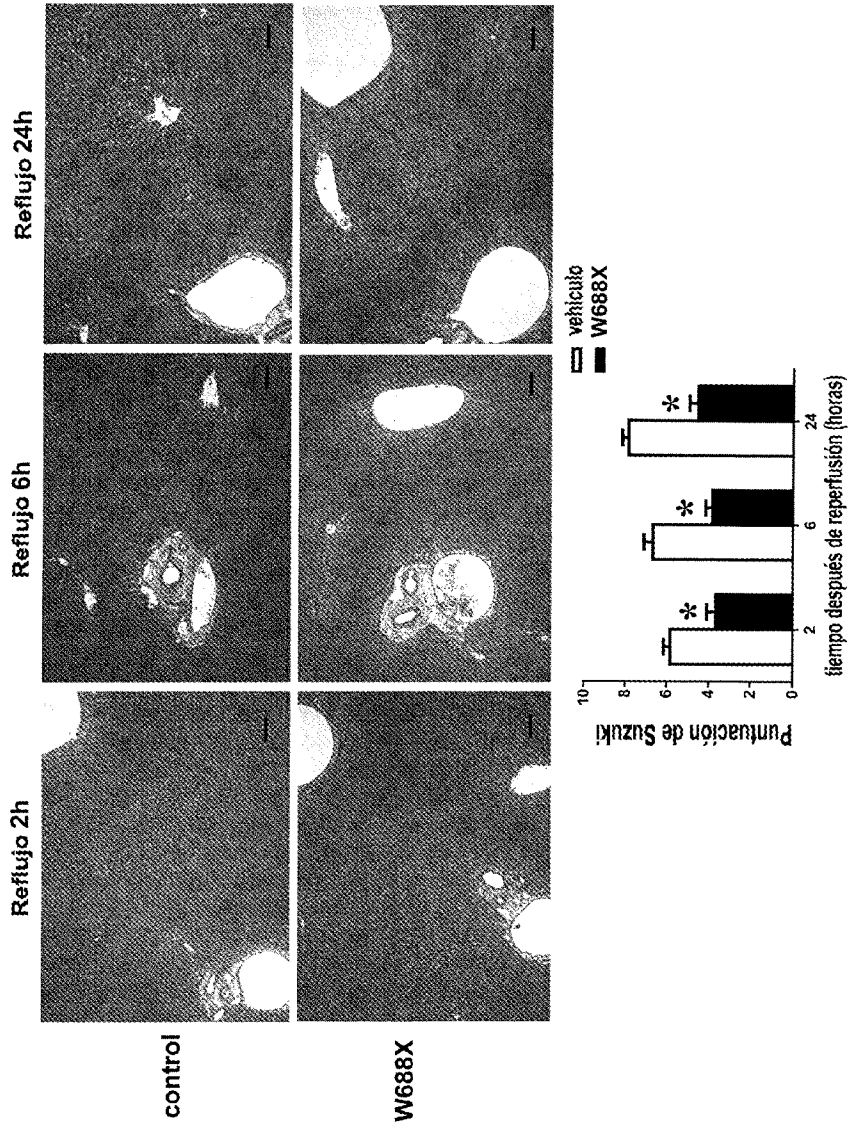


Fig. 45

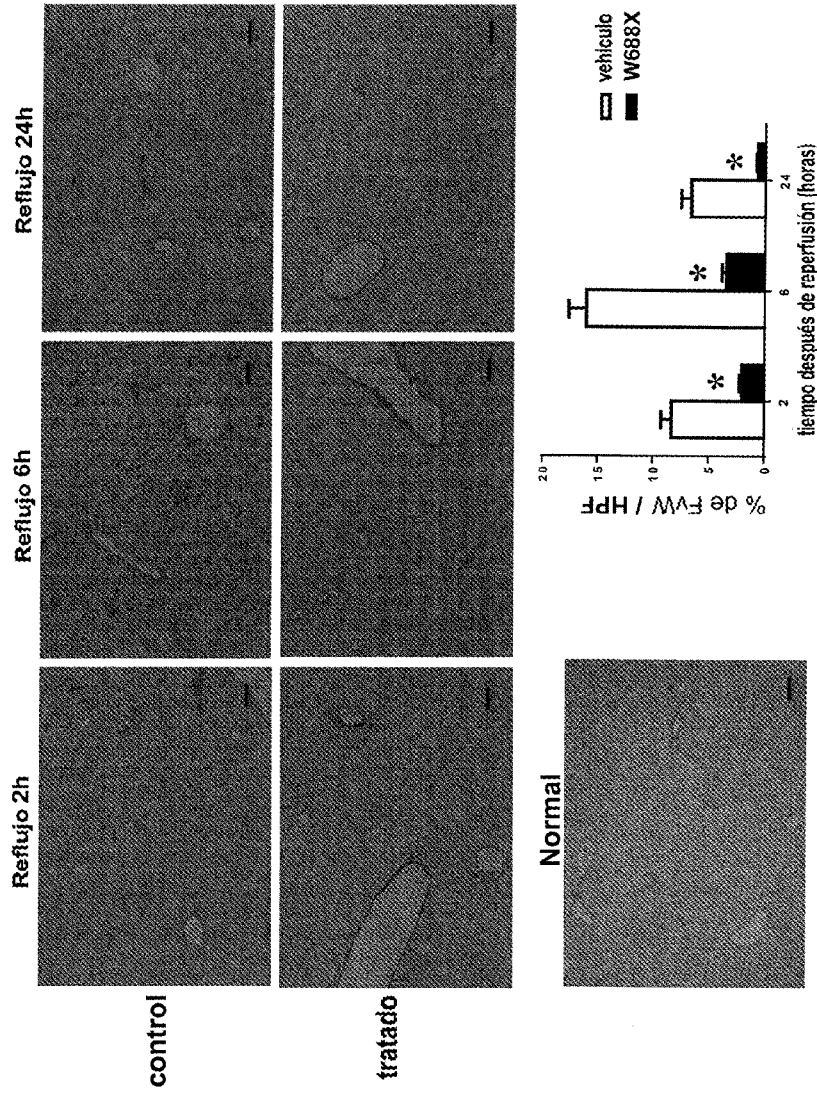


Fig. 46

