



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 641**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03791928 .9**

96 Fecha de presentación : **29.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1539991**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Ensayo de diagnóstico para determinar inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI).**

30 Prioridad: **29.08.2002 US 406756 P**

73 Titular/es: **American Diagnostica, Inc.**
500 West Avenue, P.O. Box 110215
Stamford, Connecticut 06911-0215, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.09.2010

72 Inventor/es: **Greenfield, Robert, S. y**
An, Seong, Soo, A.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.09.2010

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Ensayo de diagnóstico para determinar inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI).

1. Campo de la invención

La invención se refiere a un ensayo de diagnóstico para medir selectivamente niveles de la forma de 35 kD del inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (abreviadamente en lo sucesivo TAFIa y TAFIai por las expresiones inglesas *Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor*) pero no la pro-enzima TAFI ni el péptido por activación N-terminal de TAFI.

2. Fundamento de la invención

Se necesita un equilibrio adecuado entre las actividades de coagulación y las cascadas fibrinolíticas tanto para proteger a los organismos de una excesiva pérdida de sangre por lesiones como para mantener el flujo sanguíneo dentro del sistema vascular. Se reconoce que las dos cascadas opuestas, la de coagulación y la fibrinolítica, comprenden una serie de conversiones de zimógenos en enzimas que terminan en las dos enzimas proteolíticas respectivas trombina y plasmina. Estas enzimas catalizan la formación y eliminación de fibrina dentro del sistema circulatorio. Los desequilibrios se caracterizan por tendencias hemorrágicas o trombóticas que pueden dar como resultado ataques cardíacos o ictus en el organismo.

El inhibidor fibrinolítica activable por trombina (TAFI) es un glicoproteína de 60 kD presente en plasma humano que modula la fibrinólisis *in vivo*. El TAFI presente en plasma es una forma de pro-enzima que es más eficazmente activada por escisión proteolítica en la Arg-92 con un complejo de trombina-trombomodulina. La forma pro-enzima de TAFI también puede ser activada por escisión proteolítica por otras enzimas proteolíticas incluyendo, pero sin limitación, trombina o plasmina. Por activación de la pro-enzima TAFI mediante escisión proteolítica con trombina-trombomodulina, se forma una enzima activa (TAFIa) de 35 kD con actividad similar a carboxipeptidasa. Esta molécula también ha sido denominada en la literatura científica como carboxipeptidasa B del plasma (abreviadamente PCPB por la expresión inglesa *Plasma CarboxiPeptidase B*), o plasma-carboxipeptidasa U (PCPU). El TAFIa pierde rápidamente su actividad enzimática a través de un proceso de inactivación dependiente de la temperatura ($t_{1/2} = 10$ min. a 37°C). La inactivación de TAFIa no se debe a un proceso proteolítico, sino más bien un cambio α -conformacional en la estructura de la proteína que puede ir seguido por un cambio en el espectro de fluorescencia de la proteína. La enzima TAFIa inactivada se denomina TAFIai (35 kD). La inactivación espontánea de TAFIa a TAFIai, que es dependiente de la temperatura, se cree que es el principal mecanismo mediante el cual la actividad de TAFIa se modula durante la fibrinólisis.

La modulación de la fibrinólisis ocurre cuando TAFIa escinde los residuos de arginina y lisina C-terminales de fibrina parcialmente degradada, inhibiendo con ello la estimulación de la activación del plasminógeno modulada por activador de plasminógeno tisular (abreviadamente t-PA por la expresión inglesa *Tisular-Plasminogen Activator*). El sistema fibrinolítico se activa principalmente por el t-PA que es proporcionado por las células dañadas en la pared de los vasos sanguíneos. El t-PA convierte el plasminógeno circulante en plasmina que es una proteasa activa y puede producir un lento aumento de la fibrinólisis o, cuando se combina con la fibrina, un rápido aumento de la fibrinólisis. El efecto del t-PA sobre la fibrinólisis puede ser bloqueado por una clase de inhibidores denominados inhibidores del activador de plasminógeno (abreviadamente PAI por la expresión inglesa *Plasminogen Activator Inhibitor*), de los cuales se han identificado varios.

La trombomodulina es un componente de la pared de los vasos sanguíneos que se une a la trombina y cambia su especificidad desde fibrinógeno a proteína C, dando como resultado una molécula que posee actividad anticoagulante, en lugar de pro-coagulante. El complejo trombina-trombomodulina cataliza la escisión de proteína C a proteína C activada, que da como resultado una sub-regulación de la cascada de coagulación inactivando proteolíticamente los co-factores esenciales, Factor Va y VIIIa. De este modo, el cuerpo regula la cascada de coagulación.

Estudios tales como los de Taylor *et al.*, *Thromb. Res.* 37:639 (1985) han sugerido que la proteína C activada no sólo es un anticoagulante, sino también un pro-fibrinolítico, tanto *in vivo* como *in vitro*. Subsiguientemente, se determinó que la proteína C sólo parece pro-fibrinolítica porque impide la activación catalizada por trombina de un inhibidor de la fibrinólisis previamente desconocido, cuyo precursor se aisló del plasma y se denominó TAFI.

El TAFI se descubrió independientemente en tres diferentes laboratorios. Inicialmente apareció como una molécula inestable similar a la carboxipeptidasa B en suero humano y fue descrita por Hendriks *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1034:86 (1990). Un año después se clonó el cDNA para la molécula, se describió su secuencia de aminoácidos, y se describió su activación por tripsina y sus propiedades enzimáticas para sustratos sintéticos de carboxipeptidasa B (véase la patente de EE.UU. 5.206.161). En 1994, Wang *et al.*, (*J. Biol. Chem.* 269:15937 (1994)) aislaron la molécula activada y la denominaron carboxipeptidasa U ("U" aludiendo la letra U al término inglés *unstable* = inestable). Subsiguientemente, Nesheirn *et al.*, (*J. Biol. Chem.* 270:14477 (1995)) mostraron que la proteína era a la vez activada por trombina e inhibía la fibrinólisis, y denominaron TAFI a esta molécula. La co-identidad de PCPB, PCPU y TAFI se ha establecido por su comportamiento cromatográfico independiente en plasminógeno-Sepharose® y las secuencias de aminoácidos que están presentes en el sitio escisión para la activación.

El mecanismo de inhibición por TAFI de la fibrinólisis se puede describir esquemáticamente como se representa en la Figura 1.

La conversión de TAFI en TAFIa y subsiguientemente a TAFIai indica un proceso fibrinolítico en curso. Por lo tanto, la presencia de TAFIa y TAFIai en plasma es un marcador del proceso fibrinolítico. Las alteraciones de los niveles de TAFI han sido identificadas en cierto número de estados patológicos que incluyen enfermedades vasculares y cardíacas, enfermedades hepáticas, hemofilia, cáncer, leucemia e ictus. Por tanto, la cuantificación precisa de los niveles de TAFI, TAFIa y TAFIai en plasma proporciona información para la comprensión y diagnóstico de muchas enfermedades en las que la fibrinólisis desempeña una función.

Están comercialmente disponibles diversos ensayos ELISA (ensayos con inmunosorbentes unidos a enzimas) que están diseñados para medir el nivel total de todas las formas de TAFI en plasma (por ejemplo, Imuclone TAFI 873 de American Diagnostica, Inc.; ELISA para TAFI de Affinity Biologicals). Se ha descrito un ensayo ELISA que solo mide la pro-enzima de TAFI de 60 kD (Stromquist *et al.*, *Thromb. Hemost* 85:12-17 (2001)). Está comercialmente disponible un ensayo cromógeno basado en un ensayo funcional que sólo mide la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI (Actichrome 874 de American Diagnostica, Inc.).

La forma pro-enzima de TAFI de 60 kD comparte epítomos antigénicos comunes con TAFIa y TAFIai. No se han descrito anticuerpos que sean específicos para TAFIa y TAFIai pero tampoco para la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI. Por consiguiente, no se ha desarrollado un ensayo ELISA que específicamente mida TAFIa y TAFIai en presencia de la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI.

Serían útiles ensayos de diagnóstico selectivos para TAFIa y TAFIai en presencia de la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI para identificar y monitorizar cambios en el proceso fibrinolítico. Dichos cambios son indicativos de enfermedades en las cuales está implicado el proceso fibrinolítico tales como, enfermedades vasculares y cardíacas, enfermedades hepáticas, hemofilia, cáncer, leucemia e ictus. Por consiguiente, en la técnica existe la necesidad de ensayos eficaces selectivos para detectar y cuantificar niveles de TAFIa y TAFIai en presencia de la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI.

La cita o la identificación de cualquier referencia bibliográfica en este apartado no han de entenderse en el sentido de que dicha cita sea una técnica anterior a la presente solicitud.

3. Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el inhibidor de carboxipeptidasa de la patata (abreviadamente PTCI por la expresión inglesa *Potato Carboxypeptidase Inhibitor*) se une tanto a TAFIa como a TAFIai, pero no a la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI ni al péptido por activación N-terminal de TAFI. En pocas palabras, la invención se refiere a un ensayo útil para medir niveles de TAFIa y TAFIai (o uno de sus derivados o variantes) que comprende detectar un complejo constituido por un resto de unión específica (tal como, pero sin limitación, PTCI) para TAFIa o TAFIai y la proteína TAFIa o TAFIai (o uno de sus derivados o variantes). En una realización, el ensayo es útil para medir específicamente niveles de TAFIa o TAFIai (es decir, detectar las formas TAFIa y/o TAFIai de TAFI pero no detectar la forma pro-enzima de 60 kD o el péptido por activación N-terminal de TAFI) en una muestra que también contiene (o que contiene potencialmente) la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI y/o el péptido por activación N-terminal de TAFI, donde el resto de unión es PTCI. En una realización particular, se detecta el complejo TAFIa/PTCI o el complejo TAFIai/PTCI con un anticuerpo anti-TAFI.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un ensayo similar a un ensayo con inmunosorbente unido a una enzima (ELISA) útil para medir niveles de la proteína TAFI y TAFIai (o uno de sus derivados o variantes) (antígeno) en soluciones que pueden contener o no contener la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI. El ensayo es útil para fines de diagnóstico relacionados con la medida de niveles de TAFIa y TAFIai.

La presente invención también se refiere a un método de analizar soluciones biológicas que incluyen, pero sin limitación, sangre, plasma, orina, suero, semen y fluido cerebral o espinal para detectar y cuantificar niveles de TAFIa o TAFIai (o uno de sus derivados o variantes). El ensayo también se puede usar para diagnosticar si un paciente sufre una enfermedad o trastorno particular relacionado con niveles alterados de TAFIa o TAFIai o niveles alterados o actividad de TAFIa o TAFIai o para monitorizar un paciente al que previamente se le ha diagnosticado dicha enfermedad o trastorno. El ensayo se puede usar además para monitorizar un paciente que recibe tratamiento para una enfermedad o trastorno particular relacionado con niveles alterados o actividad de TAFIa o TAFIai y/o para monitorizar un paciente que recibe un tratamiento que altera los niveles o la actividad de TAFIa o TAFIai. En ciertas realizaciones, el tratamiento es una terapia anti-coagulante. En otras realizaciones, el tratamiento es una terapia pro-coagulante. En otras realizaciones, el tratamiento es anti-fibrinolítico o pro-fibrinolítico.

En una realización particular, el paciente tiene o es susceptible de tener una enfermedad o trastorno hemorrágico. En una realización particular, la enfermedad o trastorno hemorrágico está asociado a un estado hiperfibrinolítico. En una realización específica, el estado hiperfibrinolítico es hemofilia A o hemofilia B.

En otra realización, el paciente tiene o es susceptible (es decir, tiene una predisposición causada por factores genéticos o medioambientales o en virtud de tener una cierta enfermedad, trastorno o estado, asociado con, o de sufrir o haber sufrido una terapia que pueda dar como resultado la enfermedad) de tener efectos secundarios de hemorragia asociados con la administración de activador de plasminógeno tisular (t-PA), o uno de sus análogos, aspirina (particularmente una sobredosis de aspirina) y/o otros anti-coagulantes.

En otra realización, el paciente tiene o es susceptible de tener una enfermedad o trastorno trombótico.

En otra realización, el paciente experimentará, experimenta o ha experimentado cirugía. En una realización particular, la cirugía es un trasplante de órganos. En otra realización particular la cirugía es cardiovascular.

En otra realización, la invención se refiere a un kit que comprende los componentes para el ensayo TAFIa/TAFIai (es decir, PTCI, patrones de TAFIa/TAFIai, agente capaz de unirse al complejo TAFIa/PTCI o al complejo TAFIai/PTCI, un sustrato de dicho agente, tampón, reactivo de extinción).

Estos y otros aspectos de esta invención serán evidentes con referencia a la descripción detallada siguiente y a los dibujos anexos. Para tal fin, se citan en la presente memoria ciertas patentes y otros documentos para exponer más específicamente diversos aspectos de esta invención. Cada uno de estos documentos se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. La cita de las referencias en la presente memoria de ningún modo ha de considerarse como la admisión de que constituyen técnica anterior.

3.1 Definiciones

Los términos “análogo”, “polimorfismo” y “variante” como se emplean en la presente memoria se refieren a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a la de una proteína particular (por ejemplo, TAFI, TAFIa o TAFIai), o uno de sus fragmentos, pero no necesariamente comprenden una secuencia o estructura de aminoácidos similar o idéntica de ese complejo de proteínas o uno de sus fragmentos. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un polipéptido que satisface al menos uno de los siguientes: (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o complejo de proteínas o uno de sus fragmentos como se ha descrito en la presente memoria (por ejemplo, TAFI, TAFIa procedente de TAFIai humano o murino); (b) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones estrictas con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o complejo de proteínas de la invención, o uno de sus fragmentos, como se describe en la presente memoria, de al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 25 residuos de aminoácidos, al menos 40 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 60 residuos de aminoácidos, al menos 70 residuos de aminoácidos, al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 90 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 125 residuos de aminoácidos, o al menos 150 residuos de aminoácidos; y (c) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o complejo de proteínas de la invención o uno de sus fragmentos como se describe en la presente memoria. Un polipéptido con estructura similar a una proteína o complejo de proteínas de la invención o uno de sus fragmentos como se describe en la presente memoria se refiere a un polipéptido que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar a la de dicha proteína o complejo de proteínas o uno de sus fragmentos como se describe en la presente memoria. La estructura de un polipéptido puede ser determinada por métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica cristalográfica.

La expresión “resto de unión” como se usa en la presente memoria se refiere a un sustrato químico o biológico capaz de unirse específicamente a, o ser unido específicamente por, TAFIa o TAFIai (es decir, una proteína u otro resto que no compite significativamente por la unión con un resto específico). Dichas sustancias químicas o biológicas incluyen, pero sin limitación, inhibidores de bajo peso molecular de TAFIa o TAFIai, péptidos, pequeñas proteínas, plasminógeno y PTCI.

El término “derivado” como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína (por ejemplo, TAFI, TAFIa o TAFIai) o complejo de proteínas de la invención o uno de sus fragmentos como se describe en la presente memoria que ha sido alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término “derivado” como se usa en la presente memoria también se refiere a una proteína o complejo de proteínas de la invención o uno de sus fragmentos que ha sido modificado, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero sin limitación, una proteína o complejo de proteínas o uno de sus fragmentos puede ser modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Un derivado de una proteína o complejo de proteínas o uno de sus fragmentos puede ser modificado por modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación escisión química específica, acetilación, formilación; o síntesis metabólica de tunicamicina. Además, un derivado de una proteína o complejo de proteínas o uno de sus

fragmentos puede contener uno o más aminoácidos no clásico(s). Un derivado de polipéptido posee una función similar o idéntica como una proteína o complejo de proteínas o uno de sus fragmentos descritos en la presente memoria.

Las frases “complejo TAFIa/PTCI”, “complejo TAFIai/PTCI” o “complejo TAFIa o TAFIai/PTC” significan un complejo formado entre TAFIa y PTCI o TAFIai y PTCI.

La frase “modulación de la fibrinólisis” significa inhibición, reducción, aumento o activación de la cascada fibrinolítica que puede tener un efecto anti-coagulante o pro-coagulante.

“Inhibidor de TAFIa” o “inhibidores de TAFIa” significa cualquier molécula que bloquee, reduzca o retarde la escisión de fibrina u otros sustratos por TAFIa.

La expresión “agente profiláctico” significa un agente capaz de evitar (prevenir) o reducir los riesgos, incidencias o recidivas de una enfermedad o trastorno en un paciente. En una realización, el agente profiláctico es uno que es capaz de evitar un trastorno hemorrágico o trombótico.

La expresión “agente terapéutico” significa un agente capaz de modificar, controlar, retrasar o invertir el curso de una enfermedad o trastorno o mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno en un paciente. En una realización, el agente terapéutico es uno que es capaz de modificar, controlar, retrasar, invertir o mejorar los síntomas de un trastorno hemorrágico o trombótico.

Los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros; ratones, ratas etc.) o un primate (por ejemplo, monos y seres humanos). Preferiblemente el sujeto o paciente es un mamífero, más preferiblemente, un ser humano.

Los términos “evitar”, “evitación” o “prevención” se refieren a la evitación de la recurrencia, extensión o comienzo de la enfermedad o trastorno hemorrágico o trombótico, o síntomas asociados con la enfermedad o trastorno, en un paciente por la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Los términos, “tratar” y “tratamiento” se refieren a la modificación, control, reversión o mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno hemorrágico o trombótico. En ciertas realizaciones, dichos términos se refieren a la minimización o retraso de enfermedad o trastorno hemorrágico.

La frase “en combinación” se refiere al uso de más de uno o varios agentes profilácticos y/o terapéuticos para tratar, evitar o manejar una enfermedad o trastorno hemorrágico. Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación de la presente invención se pueden administrar concomitantemente o secuencialmente. Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación de la presente invención también se pueden administrar cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguida por la administración de un segundo agente durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo, para reducir el desarrollo de la resistencia a una de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

Los términos “manejar” y “manejo” se refieren a los efectos beneficiosos que un paciente obtiene de un agente profiláctico o terapéutico, que no dan como resultado la curación del trastorno. En ciertas realizaciones, se le administra a un paciente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos para “manejar” una enfermedad o trastorno, o síntomas asociados con el trastorno o enfermedad, de modo que impidan la progresión o empeoramiento de la enfermedad o trastorno.

El término “t-PA” se refiere a t-PA natural t-PA recombinante, así como a homólogos, derivados y polimorfismos de t-PA que retienen la actividad catalítica del t-PA natural.

Las frases “se une específicamente TAFIa o TAFIai” o “es unido específicamente por TAFIa o TAFIai”. como se usan para describir la unión a un resto químicamente o biológicamente significan que el resto químico o biológico se une a, o es unido por no más de 10%, más preferiblemente no más de 5%, más preferiblemente no más de 2%, más preferiblemente no más de 1%, más preferiblemente no más de 0,5%, más preferiblemente no más de 0,1%, más preferiblemente no más de 0,01% y más preferiblemente no más de una cantidad indetectable en el ensayo particular que se usa, de la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI.

La frase “que mide específicamente el nivel de TAFIa o TAFIai” significa detectar la cantidad de TAFIa o TAFIai en una muestra sin detectar una cantidad significativa (por ejemplo, no más de 10%, más preferiblemente no más de 5%, más preferiblemente no más de 2%, más preferiblemente no más de 1%, más preferiblemente no más de 0,5%, más preferiblemente no más de 0,1%, más preferiblemente no más de 0,01% de la cantidad presente en la muestra) de la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI.

La frase “TAFIa estabilizado” significa TAFIa que tiene una semivida de al menos una hora a temperatura ambiente, más preferiblemente de al menos dos horas, más preferiblemente de al menos cuatro horas, más preferiblemente de al menos ocho horas, más preferiblemente de al menos doce horas, más preferiblemente de al menos veinte horas y como máximo preferiblemente de al menos cuarenta y ocho horas, todas a temperatura ambiente.

4. Breve descripción de las figuras de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática del mecanismo de la inhibición de fibrinólisis por TAFI.

La Figura 2 muestra una correlación lineal entre el desarrollo de color y el nivel de TAFIa en patrones diluidos en serie.

La Figura 3 muestra la especificidad del ensayo ELISA para TAFIa y TAFIai en presencia de TAFI (pro-enzima de 60 kD).

La Figura 4 ilustra la cuantificación de antígeno TAFIa/TAFIai en plasma de plasma normal mezclado (abreviadamente PNP por la expresión inglesa *Pooled Normal Plasma*) y de pacientes hemofílicos.

La Figura 5 muestra los niveles totales de TAFI (TAFI + TAFIa + TAFIai) en plasma normal mezclado (PNP) y plasmas de pacientes hemofílicos.

La Figura 6 muestra los porcentajes de niveles de TAFI total (TAFI + TAFIa + TAFIai) aportados por TAFIa TAFIai en plasma normal mezclado (PNP) y plasmas de pacientes hemofílicos.

5. Descripción detallada de la invención

5.1 Ensayo específico de TAFIa/TAFIai

La presente invención se dirige a un ensayo útil para medir niveles TAFIa/TAFIai (o a uno de sus derivados o variantes) en una muestra, que puede contener o no contener la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI, para detectar TAFIa y TAFIai, pero no la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI ni el péptido por activación N-terminal de TAFI. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el inhibidor de carboxipeptidasa de la patata (PTCI) es capaz de unirse al TAFIai, así como al TAFIa, pero no a la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI ni al péptido por activación N-terminal. El ensayo es útil para fines de diagnóstico relacionados con la medida específica de niveles de TAFIa y TAFIai (o uno de sus derivados o variantes), pero no niveles de la forma pro-enzima de 60 kD ni el péptido por activación N-terminal de TAFI, en una muestra que puede contener o no contener la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI.

En una realización preferida, el ensayo mide el nivel de TAFIa y TAFIai en una solución. Preferiblemente, el ensayo se usa para medir el nivel de TAFIa y TAFIai en una solución biológica (por ejemplo, sangre, plasma, orina, suero, semen y fluido cerebral o espinal). El ensayo también se puede usar para cuantificar los niveles de TAFIa y TAFIai en muestras de tejidos, así como en sistemas enzimáticos purificados y fluidos de cultivos celulares.

En ciertas realizaciones, la invención se dirige a cualquier ensayo que use un resto de unión que específicamente se una a TAFIa y/o TAFIai, pero no a la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI ni al péptido por activación N-terminal de TAFI, y en donde se detecta luego el complejo TAFIa/resto de unión o el complejo TAFIai/resto de unión. En una realización, el resto de unión es un inhibidor de bajo peso molecular. En otra realización, el resto de unión es una pequeña proteína. En otra realización, el resto de unión es plasminógeno. En otra realización, el resto de unión es un anticuerpo específico de TAFIa o TAFIai. En una realización preferida, el resto de unión es PTCI o uno de sus derivados o análogos.

La formación de complejos se detecta directamente, es decir, cuando el resto de unión está marcado detectablemente (por ejemplo, un marcador colorimétrico, fluorescente, quimioluminescente, enzimático, radioactivo o magnético), o por un reactivo que se unen al complejo, estando dicho reactivo marcado detectablemente.

Los métodos de la presente invención se pueden aplicar a cualquier formato de ensayo conocido en la técnica, o sus variaciones. En una realización, el ensayo es un inmunoensayo basado en anticuerpos, en las donde las proteínas interactúan con TAFIa o TAFIai o un complejo TAFIa o TAFIai/resto de unión. Los inmunoensayos para detectar antígenos son bien conocidos en la técnica, e implican la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El antígeno se puede añadir en forma líquida, cuando se realiza en placas de inmunodifusión o inmovilizado en una superficie, cuando se realiza usando ensayo con inmunsorbente unido a enzima ("ELISA") en el popular formato de 96 pocillos. En un ensayo de inmunodifusión, el complejo antígeno-anticuerpo se puede detectar como una línea de precipitación. En un radioinmunoensayo ("RIA"), se usa un isótopo radioactivo para detectar la presencia del antígeno. En un inmunoensayo enzimático, se usa un marcador detectable producido por actividad enzimática (por ejemplo, por un sustrato cromógeno, fluorógeno o radioactivo) para detectar la presencia del antígeno (Engvall and Perlmann, 1972, "Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes" *J. Immunol.* 109:129-35). En una realización preferida, el anticuerpo usado en el inmunoensayo se une específicamente a TAFIa o TAFIai y se une a no más de 10%, más preferiblemente no más de 5%, más preferiblemente no más de 2%, más preferiblemente no más de 1%, más preferiblemente no más de 0,5%, más preferiblemente no más de 0,1%, más preferiblemente no más de 0,01% y lo más preferiblemente no más de una cantidad indetectable (es decir, indetectable en el método de ensayo particular) de la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI. Alternativamente, dicho inmunoensayo se usa para detectar TAFIa o un

complejo TAFIai/resto de unión. Por ejemplo se usa un anticuerpo que reconoce TAFIa o TAFIai (y también puede reconocer la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI cuando el complejo ha sido aislado de la muestra).

Un tipo de inmunoensayo es la técnica “sándwich”. Los ensayos sándwiches usan comúnmente un dispositivo lector de ELISA e implican el uso de al menos dos anticuerpos. Típicamente, una muestra que contiene potencialmente el antígeno se pone en contacto con un primer anticuerpo en un soporte sólido. Después de retirar la muestra no unida (por ejemplo, la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI), un segundo anticuerpo conjugado con enzima se pone en contacto con el antígeno unido al primer anticuerpo se pone en contacto con el complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo sobre el sustrato. Después de retirar el segundo anticuerpo no unido un sustrato (por ejemplo, por un sustrato colorimétrico, fluorescente, quimioluminescente, radiactivo o magnético) de la enzima. La producción de un marcador detectable indica la presencia del antígeno en la muestra, y la cantidad de marcador detectable producido o la velocidad de producción de un marcador detectable se pueden usar para determinar la cantidad del antígeno. En esta realización, el anticuerpo u otra proteína de unión sobre el sobre el soporte sólido se une específicamente a TAFIa o TAFIai. El segundo anticuerpo no necesita necesariamente unirse específicamente a TAFIa o TAFIai porque una etapa de lavado eliminará cualquier proteína no unida antes de la adición del segundo anticuerpo.

En una variación de la técnica sándwich, un resto no de anticuerpo que específicamente se une a, o es unido específicamente por, TAFIa o TAFIai es inmovilizado sobre un soporte sólido. En una realización, el ensayo comprende PTCI que está inmovilizado sobre un soporte sólido. En otra realización, el ensayo comprende un inhibidor de bajo peso molecular, una proteína pequeña o plasminógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. En una realización particular, el soporte sólido es una placa de microtitulación o una tira con micropocillos. En realizaciones en donde se usa un formato de ensayo ELISA, se puede usar un lector estándar de placas ELISA para analizar los resultados del ensayo y cuantificar la cantidad de TAFIa o TAFIai presente en la muestra.

En otra realización, el soporte sólido usado en el ensayo es una perla o micropartícula. En esta realización, un anticuerpo u otro resto que específicamente se une a, o es unido específicamente por, TAFIa o TAFIai es inmovilizado sobre la perla o micropartícula. En una cierta realización la perla o micropartícula está en una suspensión (por ejemplo, para uso en citometría de flujo o en un ensayo citométrico). Luego se detecta la interacción entre TAFIa o TAFIai y el anticuerpo u otro resto que específicamente se une a, o es unido específicamente por, TAFIa o TAFIai o se cuantifican las perlas con TAFIa o TAFIai unidos. Dichos métodos de detección son bien conocidos en la técnica. En realizaciones específicas, la perla o micropartícula puede estar modificada con poliestireno, resina acrílica, material magnético, colorante, carboxilato o modificada con estreptavidina.

En otra realización, el soporte sólido es un biochip. En esta realización, el anticuerpo u otro resto que específicamente se une a, o es unido específicamente por, TAFIa o TAFIai está inmovilizado en un biochip y se detecta subsiguientemente la unión de TAFIa o TAFIai.

En otra realización, el ensayo comprende usar PTCI para detectar TAFIa o TAFIai en un gel o TAFIa o TAFIai que ha sido resuelto por electroforesis (por ejemplo, análisis por transferencia Western, PAGE o SDS-PAGE).

En una realización, el ensayo comprende PTCI que está libre en solución. En una realización particular, el ensayo comprende PTCI que está libre en solución para detectar TAFIa o TAFIai que está inmovilizado sobre un soporte sólido. En esta realización, el TAFIa o TAFIai pueden estar inmovilizados en una placa de 96 pocillos tal como en un ensayo ELISA, sobre una perla o micropartícula, o en un biochip como en los formatos de ensayo antes indicados.

En otra realización, el ensayo comprende el uso de un agente capaz de unirse a, o ser unido por, un complejo de TAFIa o TAFIai/PTCI. No es necesario que este agente sea específico para TAFIa o TAFIai si se ha realizado una etapa de lavado después de la formación del complejo TAFIa o TAFIai/PTCI. Sin embargo, si el protocolo del ensayo particular que se usa permite que estén presentes otras formas de TAFI (por ejemplo, la forma pro-enzima de 60 kD), se prefiere que el agente sea específico para el complejo TAFIa o TAFIai/PTCI. En particular, este agente es cualquier resto que se una a, o es unido por, un complejo TAFIa/PTCI. En una realización, el agente se une a la región de TAFIa o TAFIai del complejo TAFIa o TAFIai/PTCI. En otra realización, el agente se une a la región PTCI del complejo TAFIa o TAFIai/PTCI, pero preferiblemente no se une al PTCI libre, a no ser que el PTCI libre haya sido retirado antes de la adición del resto que se une al complejo TAFIa/PTCI o al complejo TAFIai/PTCI. En otra realización, el agente se une tanto a la región TAFIa o TAFIai como a la región PTCI del complejo TAFIa o TAFIai/PTCI. En una realización preferida, el agente es un anticuerpo que se une a TAFIa y/o TAFIai. En una realización, el agente (por ejemplo, anticuerpo) se marca de modo que su presencia sea detectable (por ejemplo, tal como con un marcador colorimétrico, fluorescente, quimioluminescente, enzimático, radioactivo o magnético). En una realización preferida, el anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai está conjugado con una enzima, a otro anticuerpo o a cualquier otro resto detectable (por ejemplo, un marcador o sonda detectable, tal como uno que sea colorimétrico, fluorescente, quimioluminescente, radioactivo o magnético). En una realización preferida, el anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai está conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP). En otra realización, el anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai esta conjugado con fosfatasa alcalina.

En todavía otra realización, el ensayo comprende el uso de un sustrato para el marcador detectable unido al agente capaz de unirse a, o ser unido por, el complejo TAFIa o TAFIai/PTCI. En una realización particular el sustrato es cromógeno, fluorescente, quimioluminescente o radioactivo. En una realización el sustrato es 3,3',5,5'-tetrametilben-

ES 2 344 641 T3

cidina (TMB). En otra realización, el sustrato es 3,3'-diaminobencidina (DAB). En otra realización, el sustrato es 4-cloro-1-naftol. En otra realización, el sustrato es o-fenilendiamina (OPD). En otra realización, el sustrato es 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). En otra realización el sustrato es fluorescente (por ejemplo, *Amplex Red*).

En los ensayos descritos anteriormente, existen métodos de detección bien conocidos que dependen del formato de ensayo elegido. Por ejemplo, los lectores de placas ELISA son bien conocidos en la técnica para estos tipos de inmunoensayos. Los espectrofotómetros y fluorómetros son bien conocidos y útiles para ensayos con una sonda cromógena o fluorescente. Los contadores de centelleo de líquidos son bien conocidos y útiles para ensayos que emplean una sonda radioactiva.

En una realización, el ensayo tiene un límite de detección inferior de 0,1 µg/mL, preferiblemente 0,02 µg/mL, más preferiblemente 0,002 µg/mL y más preferiblemente 0,001 µg/mL de TAFIa o TAFIai.

5.1.1. Ensayo similar a ELISA específico de TAFIa/TAFIai

En una realización preferida la presente invención se refiere a un ensayo similar al de inmunsorbente con enzima unida (ELISA) útil en medir niveles de TAFIa y TAFIai (o uno de sus derivados o variantes) en soluciones que pueden contener o no contener la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI. El ensayo es útil para fines de diagnóstico relacionados con la medida de niveles de TAFIa y TAFIai (o uno de sus derivados o variantes) en una solución que puede contener o no puede contener la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido por activación N-terminal de TAFI.

El ensayo similar a ELISA de acuerdo con la presente invención es un ensayo que utiliza un resto capaz de unirse específicamente a, o ser unido por, TAFIa y/o TAFIai. En ciertas realizaciones el resto capaz de unirse específicamente a, o ser unido específicamente por, TAFIa y/o TAFIai es un inhibidor de bajo peso molecular, una pequeña proteína, plasminógeno o un anticuerpo específico de TAFIa o TAFIai (es decir, se une a TAFIa o TAFIai pero no se une específicamente la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o al péptido por activación N-terminal de TAFI).

En una realización preferida el resto capaz de unirse específicamente a, o ser unido específicamente por, TAFIa y/o TAFIai es el inhibidor PTCI de TAFI. Preferiblemente, el PTCI se usa como un agente de unión inmovilizado al cual se unen específicamente TAFIa y/o TAFIai en una muestra.

En una realización el ensayo comprende revestir un soporte sólido (por ejemplo, una placa de microtitulación, una tira de micropocillos, una perla o una micropartícula) con PTCI seguido por exposición del soporte sólido revestido con PTCI a una muestra para determinar los niveles de TAFIa o TAFIai en dicha muestra. Solamente TAFIa y TAFIai se unirán al PTCI inmovilizado y serán detectados en la muestra. Preferiblemente, hay una etapa de lavado en este momento del protocolo de ensayo para retirar las formas no unidas de TAFI. El soporte sólido revestido con PTCI se expone subsiguientemente a un agente capaz de unirse a, o ser unido por, TAFIa o TAFIai (por ejemplo, un anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai, preferiblemente conjugado con un marcador detectable, tal como, por ejemplo peroxidasa de rábano silvestre (HRP)), pero no es necesariamente específico de TAFIa o TAFIai (es decir, puede unirse a la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI, tal como Imuclone TAFI 873 de American Diagnostica, Inc.). Finalmente, se añade un sustrato (preferiblemente de HRP, por ejemplo, tetrametilbencidina (TMB)) para detectar la presencia del agente anti-TAFIa o anti-TAFIai.

En otra realización, el ensayo comprende revestir un soporte sólido (por ejemplo, una placa de microtitulación, una tira de micropocillos, una perla o una micropartícula) con PTCI seguido por exposición del soporte sólido revestido con el PTCI a una muestra para determinar los niveles de TAFIa o TAFIai en dicha muestra. Solamente TAFIa y TAFIai se unirán al PTCI inmovilizado y serán detectados en dicha muestra. Preferiblemente, hay una etapa de lavado en este momento del protocolo de ensayo para retirar las formas no unidas de TAFI. El soporte sólido revestido con PTCI se expone subsiguientemente a un agente capaz unirse a, o ser unido por, TAFIa o TAFIai (por ejemplo, un anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai, en una realización un anticuerpo monoclonal, en otra realización un anticuerpo monoclonal humano, en todavía otra realización AHTAFI-5024 o AHTAFI-5026), pero no necesariamente específico de TAFIa o TAFIai (es decir, puede unirse a la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI, tal como Imuclone TAFI 873 de American Diagnostica, Inc.). Esta etapa va seguida preferiblemente por una etapa de lavado y luego por la adición de un segundo anticuerpo que tiene un marcador detectable, tal como un conjugado marcado con IgG- HRP anti-ratón (por ejemplo, conjugado IgG-HRP anti-ratón de asno). Finalmente, se añade un sustrato (preferiblemente de HRP, por ejemplo, tetrametilbencidina (TMB)) para detectar la presencia de agente anti-TAFIa o anti-TAFIai.

La adición de sustratos de TMB da como resultado la producción de un producto cromógeno (azul) que se vuelve amarillo por extinción de la reacción con ácido sulfúrico. La absorbancia de la solución se mide a 450 nm y es directamente proporcional a la cantidad de TAFIa/TAFIai presente en la solución.

En una realización preferida el ensayo similar a ELISA mide el nivel de TAFIa y TAFIai en una solución. Preferiblemente, el ensayo se usa para medir el nivel de TAFIa y TAFIai en una solución biológica (por ejemplo, sangre, plasma, orina, suero, semen, esputos y fluido cerebral o espinal). El ensayo también se puede usar para cuantificar los niveles de TAFIa y TAFIai en muestras de tejidos, así como sistemas enzimáticos purificados y fluidos de cultivos celulares.

En una realización el ensayo comprende el inhibidor PTCI de TAFI; un patrón de TAFIa; un inmunoc conjugado anti-humano de TAFI-HRP; un sustrato cromógeno de HRP, tal como OPD o TMB; un tampón apropiado, por ejemplo, Tris-HCl 200 mM, tampón de pH 7,4; y un reactivo de extinción, por ejemplo, H₂SO₄ 0,45 M.

En otra realización el ensayo comprende el inhibidor PTCI de TAFI; un patrón de TAFIa; un anticuerpo monoclonal anti-humano de TAFI (por ejemplo, AHTAFI.5024 o AHTA.FI-5026, comercialmente disponibles de Haematological Technologies, Essex Junction, CT); conjugado marcado con IgG-HRP anti-ratón de asno (comercialmente disponible en Jackson Laboratories, Jackson, ME); un sustrato cromógeno de HRP, tal como OPD o TMB; un tampón apropiado, por ejemplo, Tris-HCl 200 mM, tampón de pH 7,4; y un agente de extinción, por ejemplo, H₂SO₄ 0,45 M.

En todavía otra realización, el anticuerpo monoclonal anti-humano de TAFI está presente en una concentración que varía desde aproximadamente 0,25 µg/mL hasta aproximadamente 1,0 µg/mL. En todavía otra realización, el conjugado marcado con IgG-HRP anti-ratón de asno se usa en una dilución de aproximadamente 1:1000 a aproximadamente 1:5000 en un tampón apropiado (por ejemplo, Tris-HCl 200 mM, tampón de pH 7,4).

En una realización el ensayo de acuerdo con la presente invención utiliza pequeños volúmenes de solución (aproximadamente 25 µL) en volúmenes totales de reacción de aproximadamente 250 µL, que hace que la lectura del ensayo sea la ideal para uso con lectores de placas de micro-ensayos de 96 pocillos. En otra realización el ensayo de acuerdo con la presente invención también se puede adaptar fácilmente a volúmenes mayores (aproximadamente 1 mL) de solución para leer en cubetas de tamaño estándar en espectrómetros convencionales de mesa de trabajo (*bench-top*). En otra realización el ensayo de acuerdo con la presente invención se puede adaptar fácilmente a volúmenes más pequeños (menos de 25 µL) para lectura en aplicaciones de escrutinio de alta productividad. El ensayo de acuerdo con la presente invención es bastante rápido, siendo el tiempo total de ensayo entre 30 y 60 minutos.

5.2 Métodos de diagnóstico

La presente invención se refiere también a un método de analizar soluciones biológicas, tales como, pero sin limitación, sangre, plasma, orina, suero, semen y fluido cerebral o espinal de un paciente específicamente en cuanto a los niveles de TAFIa/TAFIai. El ensayo puede ser usado para diagnosticar una enfermedad o trastorno particular o monitorizar un sujeto al que previamente se le ha diagnosticado una enfermedad o trastorno particular. El ensayo se puede usar también para monitorizar un sujeto que recibe tratamiento para una enfermedad o trastorno particular. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno es cualquiera de dichas enfermedades o trastornos asociados con la hiperfibrinólisis. En una realización, la enfermedad o trastorno es causada por hiperfibrinólisis. En otra realización, la hiperfibrinólisis es causada por la enfermedad o trastorno.

El resultado del ensayo de diagnóstico se puede interpretar por comparación con controles o en relación con un parámetro establecido a través de análisis estadístico de resultados de ensayos previos. En una realización la cantidad de TAFIa/TAFIai en una muestra de un sujeto se compara con el del (de) sujeto(s) conocido(s) que no tienen un enfermedad o trastorno particular (véase por ejemplo, el Ejemplo 6.4). En otra realización, el nivel (o intervalo de valores) de TAFIa/TAFIai en una muestra es indicativo de la presencia o ausencia de una enfermedad particular se ha determinado mediante un análisis estadístico de una población adecuada de sujetos. La determinación de dicho parámetro puede ser conseguida por un experto en la técnica usando métodos conocidos.

En una realización, la enfermedad o trastorno hemorrágico incluye, pero sin limitación, hemofilia A, hemofilia B, anemia hemolítica autoinmune, enfermedades del colágeno, enfermedad de von Willebrand (VWD), púrpura de Henoch-Schonlein, hemorragias agudas ampliamente generalizadas, hiperfibrinólisis primaria, equistomatosis hepatoesplénica, deficiencias de Factores sanguíneos y hemostasis.

En otra realización, la enfermedad o trastorno trombótico incluye, pero sin limitación, ataque cardíaco, ictus, enfermedad tromboembólica, infarto de miocardio agudo (AMI), trombosis venosa profunda, ataque isquémico agudo, embolismo pulmonar masivo, coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome anti-fosfolípidos, trombofilia familiar, sepsis por púrpura trombocitopénica trombótica, artritis, hepatitis fulminante y trombosis.

Las enfermedades y trastornos hemorrágicos y trombóticos ocurren, en parte, porque el equilibrio normal entre la coagulación y las cascadas fibrinolíticas ha sido afectado, alterado o cambiado. Los métodos de la presente invención permiten que sea detectado el cambio del equilibrio de las cascadas, facilitando por tanto la diagnosis o monitorización del tratamiento para enfermedades o trastornos hemorrágicos o trombóticos.

En otra realización la enfermedad o trastorno hemorrágico es un efecto secundario de hemorragia asociado a la administración de activador de plasminógeno tisular (t-PA), activador de plasminógeno de uroquinasa (t-PA), estreptoquinasa, estafiloquinasa, plasminógeno o sus análogos, heparina, heparina de bajo peso molecular, aspirina (por ejemplo, sobredosis) o cualquier otro anti-coagulante (por ejemplo, sobredosis). En ciertas realizaciones los efectos secundarios incluyen pero sin limitación, transformación hemorrágica (HT).

5.2.1. Población objeto

En ciertas realizaciones la invención proporciona métodos para cuantificar niveles de TAFIa y TAFIai (o sus derivados y variantes) en un sujeto. El sujeto es preferiblemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratones, ratas, etc.) o un primate (por ejemplo, monos, tales como monos cinomolgos y seres humanos). En una realización preferida el sujeto es un ser humano.

En una realización, el sujeto tiene o es susceptible de tener una enfermedad o trastorno hemorrágico y/o trombótico, o cualquier otro asociado a niveles aberrantes de TAFIa o TAFIai, o una enfermedad o trastorno que puede ser tratado, impedido o manejado por modulación (por ejemplo, aumento o disminución) de la actividad de TAFI, TAFIa o TAFIai.

En ciertas realizaciones el sujeto tiene o es susceptible de tener una enfermedad o trastorno asociado con la hiperfibrinólisis. En una realización, la enfermedad o trastorno está causada por hiperfibrinólisis. En otra realización, la hiperfibrinólisis es causada por la enfermedad o trastorno.

La invención también abarca métodos para cuantificar niveles de TAFIa y TAFIai (o sus derivados o variantes) en un sujeto que está recibiendo o ha recibido cualquier tratamiento útil para la prevención de enfermedades o trastornos hemorrágicos y/o trombóticos. En una realización preferida, la enfermedad o trastorno hemorrágico y/o trombótico incluye, pero sin limitación, hemofilia A, hemofilia B, anemia hemolítica autoinmune, enfermedades del colágeno, enfermedad de von Willebrand (VWU), púrpura de Henoch-Schönlein, hemorragia aguda ampliamente generalizada, hiperfibrinólisis primaria, esquistosomiasis hepatoesplénica, deficiencias de Factores sanguíneos, hemostasis, ataque cardíaco, ictus, enfermedad tromboembólica, infarto de miocardio agudo (AMI), trombosis de vena profunda, ataque isquémico agudo, embolismo pulmonar masivo, coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome anti-fosfolípidos, trombofilia familiar, sepsis por púrpura trombocitopénica trombótica, artritis, hepatitis fulminante y trombosis, enfermedad hepática; cirrosis hepática aguda o crónica, anemia hemolítica autoinmune o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por una excesiva hemorragia o coagulación.

En una realización preferida el sujeto tiene o es susceptible de tener hemofilia A o hemofilia B.

En otra realización el sujeto estará experimentando o ha experimentado recientemente una operación quirúrgica. En una realización el procedimiento quirúrgico es cardiovascular tal como cirugía de colocación de un *bypass* o injerto en la aorta. En otra realización la operación quirúrgica es un trasplante de órgano. En realizaciones específicas el trasplante de órgano es un trasplante de hígado o trasplante de corazón.

El ensayo también se puede usar para determinar los niveles de TAFIa y TAFIai (o sus derivados o variantes) en un sujeto que recibe terapias convencionales o experimentales que se usan para prevenir, tratar o manejar enfermedades o trastornos hemorrágicos y/o trombóticos.

En una realización, la invención proporciona métodos para cuantificar los niveles de TAFIa y TAFIai en un sujeto que habitualmente experimenta tratamiento para una enfermedad o trastorno hemorrágico o trombótico.

En otra realización la invención proporciona métodos para cuantificar los niveles de TAFIa y TAFIai en un sujeto que previamente ha experimentado tratamiento para una enfermedad o trastorno hemorrágico.

En otra realización, la invención proporciona métodos para cuantificar los niveles de TAFIa y TAFIai en un sujeto que nunca ha experimentado tratamiento para una enfermedad o trastorno hemorrágico o trombótico.

En una realización el tratamiento para la enfermedad o trastorno hemorrágico es una terapia pro-coagulante. En ciertas realizaciones la terapia pro-coagulante es la administración de ácido aminocaproico, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor VIIa, Factor IXa, proteína C activada, trombina, fibrinógeno o plasma crio-fraccionado.

En una realización el tratamiento para el trastorno trombótico es terapia anti-coagulante. En ciertas realizaciones la terapia anti-coagulante es activador de plasminógeno (t-PA), activador de plasminógeno uroquinasa (u-PA) o uno de sus análogos estreptoquinasa, estafiloquinasa, plasminógeno o sus análogos, heparina, heparina de bajo peso molecular o aspirina.

En otra realización el sujeto le ha sido administrado TAFIa estabilizado (véase la solicitud de patente de EE.UU. N° 10/116.095, presentada el 4 de abril de 2002, incorporada en la presente memoria como referencia), un inhibidor de TAFIa o una de sus composiciones farmacéuticas. En una realización particular el TAFIa estabilizado, el inhibidor de TAFIa o una de sus composiciones farmacéuticas se administró concurrentemente con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos en la misma composición farmacéutica. En otra realización el TAFIa estabilizado, el inhibidor de TAFIa, o su composición farmacéutica se administró concurrentemente con uno o más de otros agentes terapéuticos o profilácticos en composiciones farmacéuticas separadas. En ciertas realizaciones el otro agente terapéutico o profiláctico es útil para el tratamiento, prevención o manejo de un trastorno hemorrágico y/o trombótico. En otras realizaciones el agente terapéutico o profiláctico no es útil para el tratamiento, prevención o manejo de un trastorno hemorrágico y/o trombótico. En ciertas realizaciones el agente terapéutico o profiláctico incluye, pero sin limitación, t-PA, heparina, aspirina, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, ácido aminocaproico, proteína C activada, trombina, fibrinógeno,

ES 2 344 641 T3

plasma crio-fraccionado, actotrombina, heparina de bajo peso molecular, hirudina, plasminógeno, estreptoquinasa, estafiloquinasa, uroquinasa o hirulongo.

5 5.3 Kits

En una realización la invención proporciona un ensayo para medir específicamente TAFIa y TAFIai en un paquete o kit que comprende en uno o más envases un agente que se une al complejo TAFIa/PTCI o al complejo TAFIai/PTCI y un patrón de TAFIa o TAFIai.

En otra realización el kit comprende tiras de micropocillos que contienen PTCI inmovilizado.

En otra realización el kit comprende una placa de microtitulación revestida con PTCI inmovilizado.

En otra realización el kit comprende perlas revestidas con PTCI inmovilizado.

En otra realización, el kit comprende un patrón de TAFIa o TAFIai, un agente que se une a, o es unido por, el complejo TAFIa o TAFIai/PTCI, una solución tampón, un sustrato del agente que se une a, o es unido por, el complejo TAFIa o TAFIai/PTCI y un agente de extinción.

En una realización el agente que se une a, o es unido por, el complejo TAFIa o TAFIai/PTCI es un anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP).

En una realización el sustrato del agente que se une a, o es unido por, TAFIa o TAFIai es TMB.

6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no de limitación.

6.1 Protocolo de ensayo TAFIa/TAFIai

6.1.1 Preparación de placas de microtitulación revestidas con PTCI

Se preparó una solución de 2 $\mu\text{g/mL}$ de PTCI disolviendo 1 mg de PTCI en 500 mL de un tampón de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOP). A cada pocillo de la placa de microtitulación (por ejemplo, una placa de microtitulación Immulon 4 (de alta unión) de 96 pocillos) se añaden 100 mL de la solución de 2 $\mu\text{g/mL}$ de PTCI y se incubó a 4°C durante una noche en una cámara húmeda. La placa se vacía luego y se lava una vez con tampón de PBS/Tween al 1% y se añaden 100 mL de solución de bloqueo (por ejemplo, SuperBloc, de Pierce Chemicals, IN) a cada pocillo de la placa de microtitulación seguido por incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las placas se vacían luego, se lavan 2 veces con tampón de PBS/Tween al 1% y se secan al aire.

6.1.2 Preparación del patrón de TAFIa/TAFIai

Se preparó el patrón de TAFIa/TAFIai añadiendo TAFI, trombina y trombomodulina en tampón. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora. El TAFIa/TAFIai se puede conservar congelado o liofilizado.

6.1.3 Preparación de anti-TAFI-HRP

Se marcaron con la enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP) por métodos conocidos (Karnbegawa, *Nippon Rinsho* 53:2160-7 (1995) 500 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo monoclonal anti-humano TAFI. El inmunoconjugado anti-humano TAFI-HRP se diluye hasta 100 $\mu\text{g/mL}$ en tampón y luego se diluye a 1 $\mu\text{g/mL}$ en tampón PBS/Tween para uso en el ensayo.

6.1.4 Método de ensayo

El ensayo para TAFIa, TAFIai, o uno de sus derivados o variantes se puede realizar directa o indirectamente.

Para el ensayo directo, el plasma se diluye 1:25 con tampón BSA/PBS/Tween al 0,5% para uso en el ensayo. El plasma de ensayo diluido se añade a micropocillos revestidos con PTCI (preparados como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.1.1) y se incubó a 37°C durante dos horas. La placa se vacía y se lava con tampón PBS/Tween. Se añaden 100 mL de inmunoconjugado de 1 mg/mL TAFI-HRP anti-humano (preparado como se ha descrito antes el apartado 6.1.2) a cada pocillo y se incubó a 37°C durante una hora. La placa se vacía y se lava dos veces con tampón PBS/Tween. Se añaden 100 mL del sustrato TMB para la enzima (Moss, PA) a cada pocillo y se deja que se desarrolle

el color en cada pocillo durante aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene por adición de 100 mL de H_2SO_4 0,45 M. Se lee la absorbancia a 450 nm.

Para el ensayo indirecto, se diluye el plasma 1:25 con tampón BSA/PBS/Tween al 0,5% para uso en el ensayo. El plasma de ensayo diluido se añade a micropocillos revestidos con PTCI (preparados como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.1.1) y se incuba a 37°C durante dos horas. La placa se vacía y se lava con tampón PBS/Tween. Se añaden 100 μL de anticuerpo monoclonal de TAFI anti-humano de 0,25-1,0 $\mu\text{g/mL}$ (tal como AHTAFI-5024 o AHTAFI.5026, comercialmente disponible en Haematological Technologies, Essex Junction, VT) a cada pocillo y se incuba a 37°C durante una hora. La placa se vacía y se lava dos veces con tampón PBS/Tween. Se añaden 100 μL de conjugado IgG-HRP anti-ratón de asno (comercialmente disponible en Jackson Laboratories, Jackson, ME) y se incuba a 37°C durante una hora. Se añaden 100 mL del sustrato TMB para la enzima HRP (Moss, PA) a cada pocillo y se deja desarrollar el color durante aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene por adición de 100 mL de H_2SO_4 0,45 M. Se lee la absorbancia a 450 nm.

6.1.5 Curva patrón de TAFIa/TAFIai

El patrón de TAFIa/TAFIai (preparado como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.1.2) se diluye formando una serie (1:2) partiendo de 125 $\mu\text{g/mL}$ y se aplica a una placa de microtitulación revestida con PTCI. El ensayo similar a ELISA se realiza luego como se ha descrito en el apartado 6.1.4. Hay una correlación lineal entre el desarrollo de color y el antígeno TAFIa/TAFIai (véase la Figura 2).

6.2 Especificidad del ensayo TAFIa/TAFIai en presencia de TAFI

Se preparó TAFIa por incubación de TAFI con trombina/trombomodulina. Se preparó TAFIai como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.1.2. Se analizaron soluciones que contenían TAFI, TAFIa y TAFIai (0,001 - 1 $\mu\text{g/mL}$) en un ensayo similar a ELISA como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.1.4. Los resultados como se muestran en la Figura 3 ilustran que el ensayo similar a ELISA mide específicamente TAFIa y TAFIai pero no TAFI.

6.3 Cuantificación de TAFIa/TAFIai en plasma procedente plasma normal mezclado (PNP) y plasma de pacientes con hemofilia

Se analizaron muestras de plasma de pacientes a los que se les había diagnosticado hemofilia A o hemofilia B (n=20) y de gente normal (plasma normal mezclado (PNP); n=2) para detectar y cuantificar el antígeno TAFIa/TAFIai usando el ensayo similar a ELISA como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.1.4. Los resultados se ilustran en la Figura 4. Se determinó que las dos muestras de PNP tenían 7-10 $\mu\text{g/mL}$ de TAFIa/TAFIai, mientras que el plasma de los pacientes con hemofilia variaba desde 3 a 17 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno TAFIa/TAFIai. Los niveles de TAFIa/TAFIai eran elevados por encima de los niveles de PNP en 12/20 muestras de plasma de pacientes con hemofilia.

Estos resultados muestran que los niveles de TAFIa/TAFIai son elevados en sueros de pacientes con hemofilia y sugieren que los pacientes que padecen hemofilia tienen un estado hiperfibrinolítico.

6.4 Cuantificación de niveles de proteína TAFI total (pro-enzima TAFI + TAFIa/TAFIai) en plasma procedente plasma normal mezclado (PNP) y plasma de pacientes con hemofilia

Se analizaron muestras de plasma de pacientes a los que les había diagnosticado hemofilia A o hemofilia B (n=20) y de gente normal (plasma normal mezclado (PNP); n=2) para detectar y cuantificar los niveles de pro-enzima TAFI usando un ensayo cromógeno funcional (Actichrome 874 de American Diagnostica, Inc.). Luego se calculó la cantidad total de proteína TAFI en cada muestra de plasma (pro-enzima TAFI + TAFIa/TAFIai) usando los datos de TAFIa/TAFIai del Ejemplo 6.3 y los resultados del ensayo para TAFI Actichrome. Los resultados se ilustran en la Figura 5. El nivel de TAFI total en el grupo de PNP (valor medio = 28 $\mu\text{g/mL}$) era significativamente mayor que el nivel de TAFI total en todas las muestras de suero de pacientes con hemofilia (valor medio 16,9 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados muestran que los niveles de TAFI en las muestras de suero de pacientes con hemofilia eran significativamente reducidos y sugiere que TAFI se metaboliza más fácilmente en suero de pacientes con hemofilia.

6.5 Porcentaje de Proteína TAFI total correspondiente al antígeno TAFIa/TAFIai total

Se calculó el porcentaje de proteína TAFI total que está representado por el antígeno TAFIa/TAFIai que está presente en muestras de plasma de pacientes a los que se les había diagnosticado hemofilia A o hemofilia B (n=20) y de gente normal (plasma normal mezclado (PNP); n=2) usando los datos de los Ejemplos 6.3 y 6.4. Los resultados se ilustran en la Figura 6. El antígeno TAFIa/TAFIai representa aproximadamente 25% del TAFI total presente en PNP, mientras que el antígeno TAFIa/TAFIai representa más del 50% del TAFI total presente en el suero de pacientes con hemofilia. En 18/20 de las muestras de suero de hemofílicos, el porcentaje de total TAFI correspondiente al antígeno TAFIa/TAFIai era significativamente mayor que en las muestras de PNP. Esto indica que el porcentaje de TAFI total que corresponde al antígeno TAFIa/TAFIai puede ser un marcador útil para la diagnosis y/o monitorización de la hemofilia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar TAFIa y TAFIai, pero no la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido de activación N-terminal de TAFI, en una muestra, comprendiendo dicho método:

(i) poner en contacto dicha muestra con un inhibidor de la carboxipeptidasa (PTCI) en condiciones que permiten la unión de PTCI a TAFIa y TAFIai; y

(ii) detectar la unión de TAFI y TAFIai a PTCI.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la carboxipeptidasa de la patata (PTCI) está inmovilizado en un soporte sólido.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el soporte sólido es una placa de microtitulación.

4. El método de la reivindicación 2, en donde el soporte sólido es una perla o micropartícula.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección comprende poner en contacto dicha muestra con un agente que se une a, o es unido por, un complejo TAFIa/PTCI o un complejo TAFIai/PTCI.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho agente es un anticuerpo monoclonal anti-TAFIa o anti-TAFIai.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección comprende poner en contacto dicha muestra con un agente que se une al anticuerpo monoclonal anti-TAFIa o anti-TAFIai, estando dicho agente conjugado con HRP.

8. El método de la reivindicación 7, en donde dicho agente es conjugado IgG-HRP anti-ratón de asno.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra es un fluido biológico de un paciente.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el fluido biológico es plasma.

11. El método de la reivindicación 9, en donde el fluido biológico es sangre, orina, suero, semen o fluido cerebral o espinal.

12. El método de la reivindicación 9, en donde el paciente tiene un trastorno trombolítico.

13. El método de la reivindicación 9, en donde el paciente tiene un trastorno hemorrágico.

14. El método de la reivindicación 9, en donde el paciente está sometido a terapia anti-coagulante.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la terapia anti-coagulante es administración de activador de plasminógeno tisular (t-PA), activador de plasminógeno de uroquinasa (u-PA) o uno de sus análogos.

16. El método de la reivindicación 14, en donde dicha terapia anti-coagulante es administración de aspirina.

17. El método de la reivindicación 14, en donde dicha terapia anti-coagulante es administración de estreptoquinasa, estafiloquinasa, plasminógeno o sus análogos, heparina o heparina de bajo peso molecular.

18. El método de la reivindicación 9, en donde el paciente está sometido a terapia pro-coagulante.

19. El método de la reivindicación 18, en donde la terapia pro-coagulante es administración de ácido aminocaproico, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor VIIa, Factor IXa, proteína C activada, trombina, fibrinógeno o plasma crío-fraccionado.

20. El método de la reivindicación 9, en donde el paciente es susceptible de padecer un trastorno trombótico.

21. El método de la reivindicación 9, en donde el paciente es susceptible de padecer un trastorno hemorrágico.

22. El método de la reivindicación 1, en donde el límite inferior de detección de TAFIa y TAFIai en la solución es aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

23. El método de la reivindicación 1, en donde el límite inferior de detección de TAFIa y TAFIai en la solución es aproximadamente 0,02 $\mu\text{g/mL}$.

24. El método de la reivindicación 1, en donde el límite inferior de detección de TAFIa y TAFIai en la solución es aproximadamente 0,002 $\mu\text{g/mL}$.

ES 2 344 641 T3

25. El método de la reivindicación 1, en donde el límite inferior de detección de TAFIa y TAFIai en la solución es aproximadamente 0,001 $\mu\text{g/mL}$.

26. Un kit que comprende en uno o más envases un soporte sólido revestido con PTCI inmovilizado, un patrón de TAFIa o TAFIai y un agente que se une a, o es unido por, un complejo TAFIa/PTCI o un complejo TAFIai/PTCI.

27. El kit de la reivindicación 26, que comprende sustrato del agente, una solución tampón y un agente de extinción.

28. El kit de la reivindicación 26, en donde el soporte sólido es una tira para un micropocillo.

29. El kit de la reivindicación 26, en donde el soporte sólido es una placa de microtitulación.

30. El kit de la reivindicación 26, en donde el soporte sólido es una perla o macropartícula.

31. El kit de la reivindicación 29, en donde el sustrato del agente que se une a, o es unido por, el complejo TAFIa/PTCI o un complejo TAFIai/PTCI es TMB.

32. Un método de diagnosticar un trastorno asociado a la fibrinólisis en un paciente, comprendiendo dicho método usar PTCI para medir específicamente el nivel de TAFIa y TAFIai, pero no la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido de activación N-terminal de TAFI en una muestra biológica de dicho paciente.

33. El método de la reivindicación 32, en donde el trastorno es un trastorno trombótico.

34. El método de la reivindicación 32, en donde el trastorno es un trastorno hemorrágico.

35. Un método de monitorizar un trastorno asociado con la fibrinólisis en un paciente, comprendiendo dicho método usar PTCI para medir específicamente el nivel de TAFIa y TAFIai, pero no la forma pro-enzima de 60 kD de TAFI o el péptido de activación N-terminal de TAFI en una muestra biológica de dicho paciente.

36. El método de la reivindicación 35, en donde el trastorno es un trastorno trombótico.

37. El método de la reivindicación 35, en donde el trastorno es un trastorno hemorrágico.

38. El método de la reivindicación 5 o el kit de la reivindicación 28, en donde dicho agente es un anticuerpo anti-TAFIa o anti-TAFIai conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP).

39. El método de la reivindicación 8 o el kit de la reivindicación 29, en donde dicha etapa de detección comprende poner en contacto dicha muestra con un sustrato de peroxidasa de rábano silvestre (HRP).

40. El método de la reivindicación 39, en donde dicho sustrato de peroxidasa de rábano silvestre (HRP) es 3,3',5,5'-tetrametilencidina (TMB).

41. El método de las reivindicaciones 12, 20, 33 o 36, en donde el trastorno trombótico es un ataque cardíaco, ictus, enfermedad tromboembólica, infarto de miocardio agudo (AMI), trombosis venosa profunda, ataque isquémico agudo, embolismo pulmonar masivo, coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome anti-fosfolípido, trombofilia familiar, sepsis púrpura trombocitopénica trombótica, artritis, hepatitis fulminante o trombosis.

42. El método de la reivindicación 13, 21, 34 o 37, en donde el trastorno hemorrágico es hemofilia A, hemofilia B, anemia hemolítica autoinmune, un enfermedad del colágeno, la enfermedad de von Willebrand (VWD), púrpura de Henoch-Schönlein, hemorragia extendida generalizada aguda, hiperfibrinólisis primaria, esquistosomiasis hepatoesplénica, deficiencias de Factores o hemostasis.

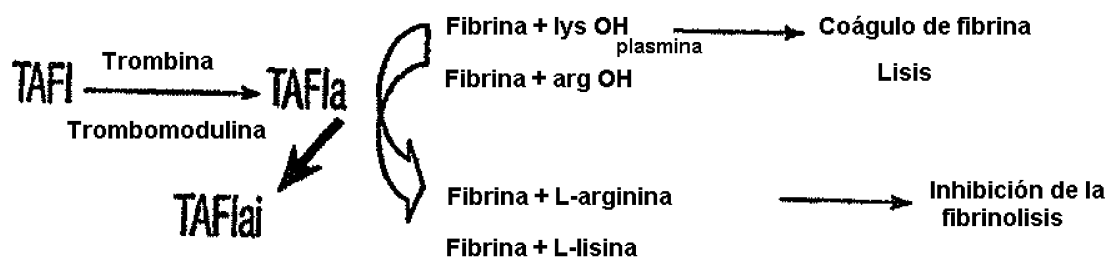


Fig. 1

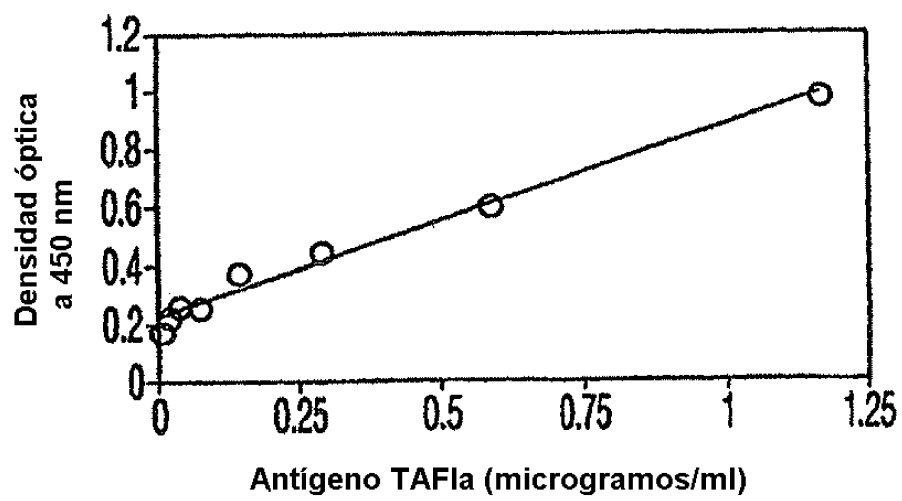


Fig. 2

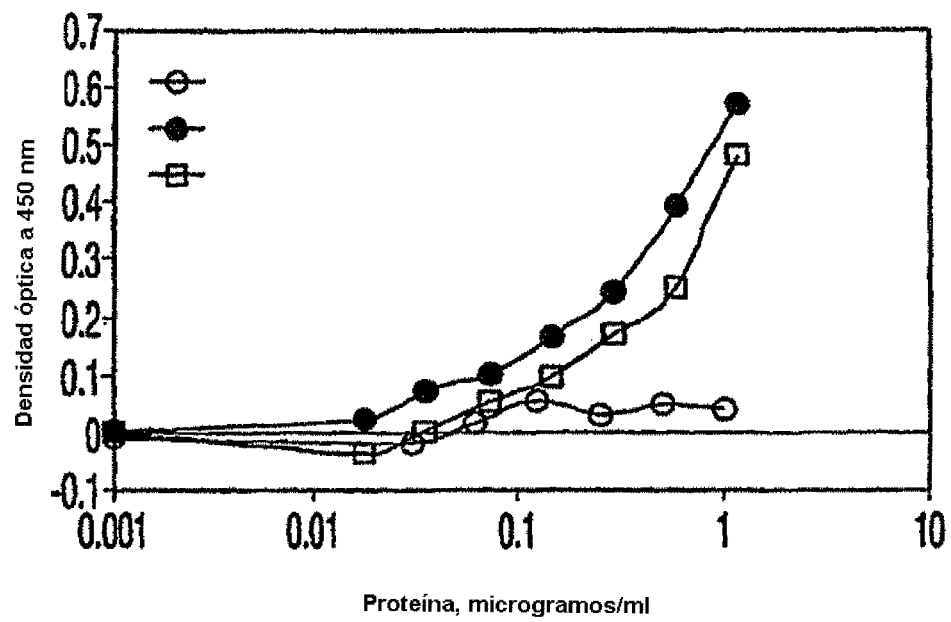


Fig. 3

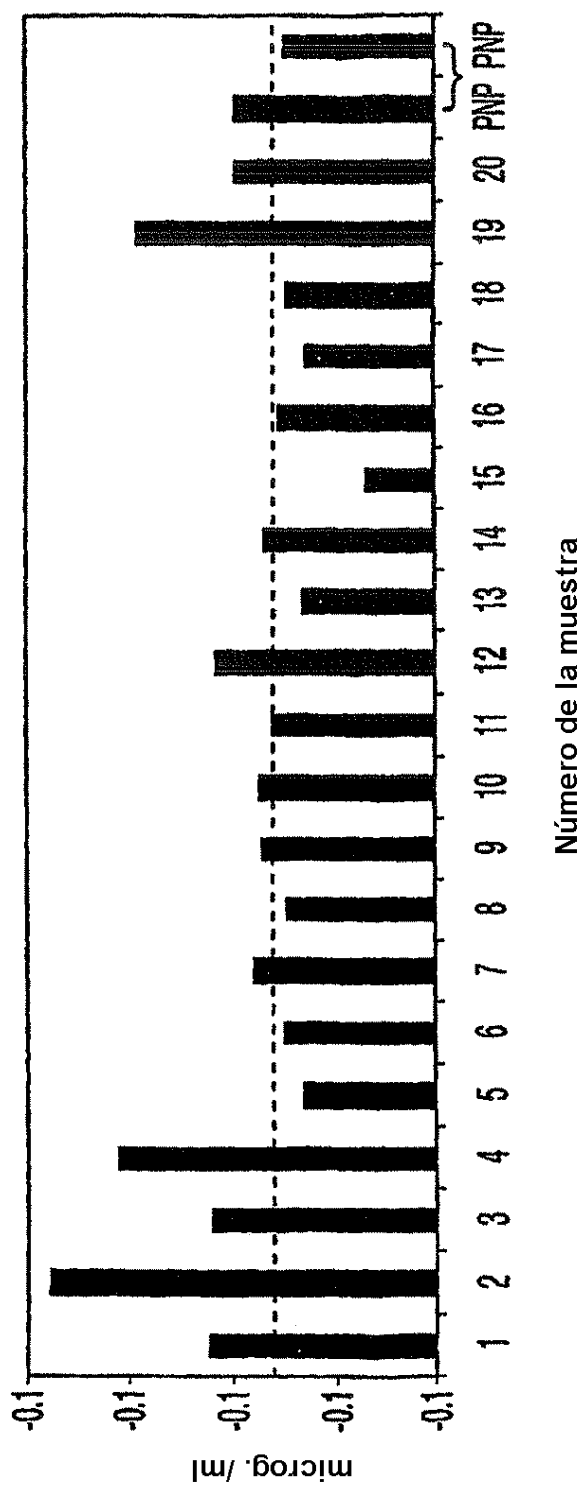


Fig. 4

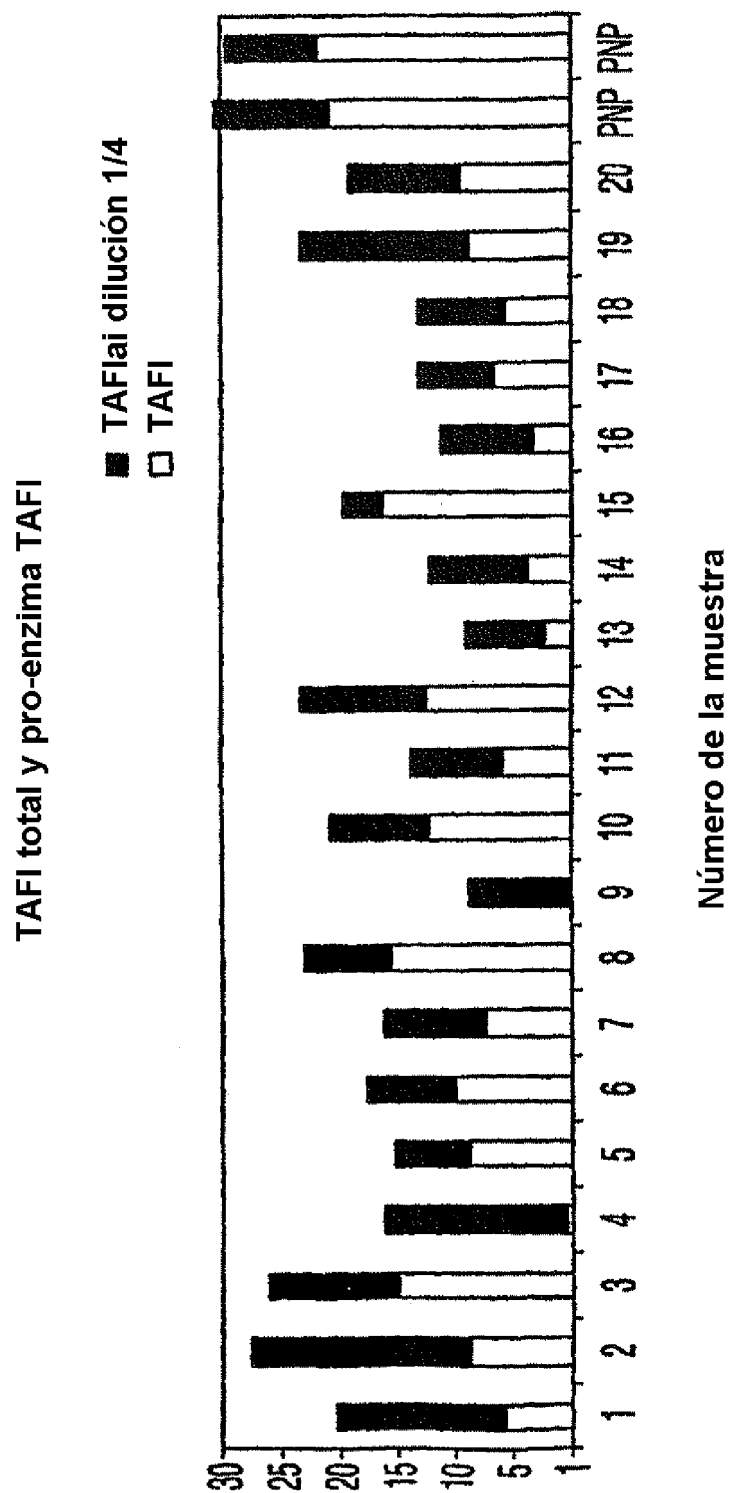


Fig. 5

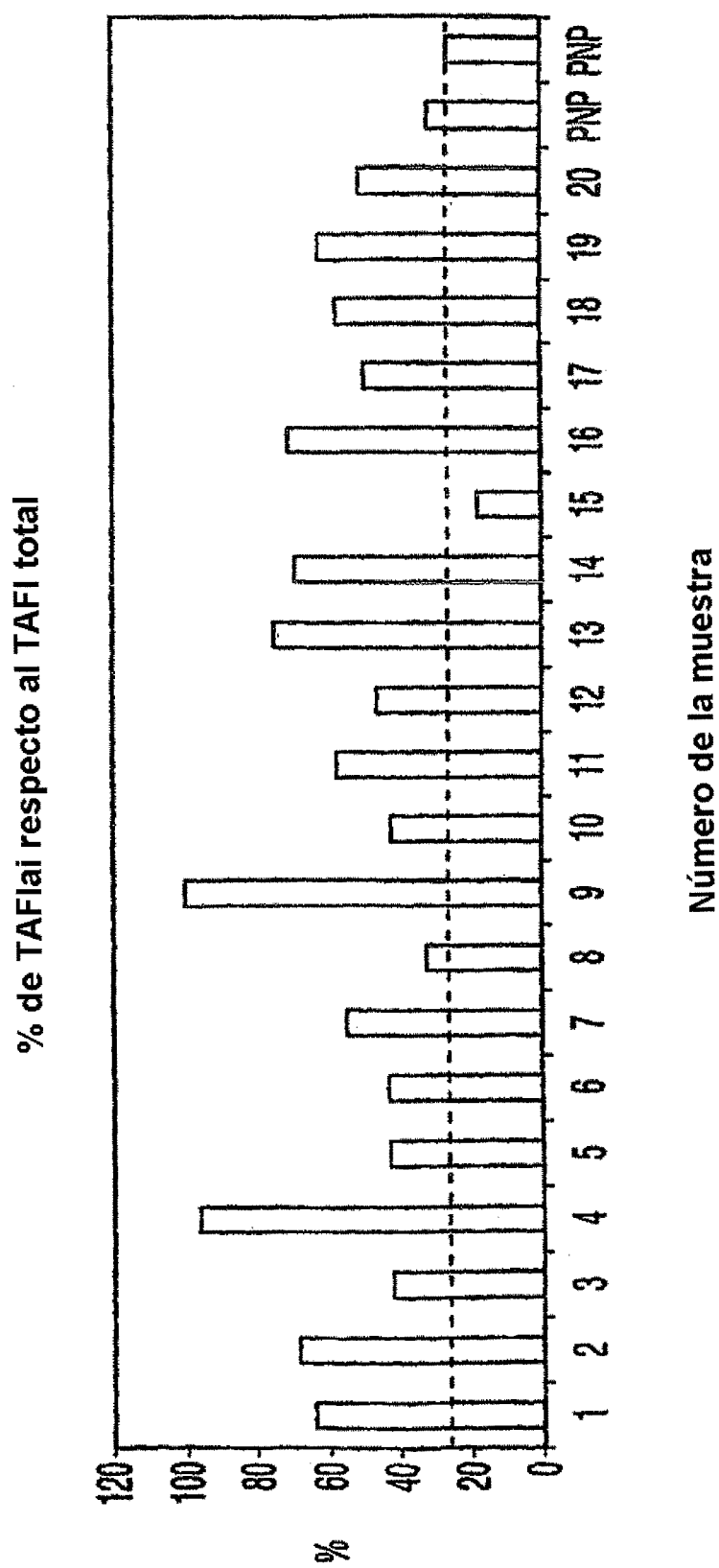


Fig. 6