

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 246**

21 Número de solicitud: 201231279

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

07.08.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2014

71 Solicitantes:

**FUNDACION PARA LA FORMACION E INVESTIGACION SANITARIAS DE LA REGION DE MURCIA (50.0%)
LUIS FONTES PAGÁN, 9 - 1ª PLANTA
30003 MURCIA ES y
UNIVERSIDAD DE MURCIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CORRAL DE LA CALLE, Javier;
MARTINEZ MARTINEZ, Irene;
MIÑANO NAVARRO, Antonia De Padua;
DE LA MORENA BARRIO, Mª Eugenia;
AGUILA MARTINEZ, Sonia;
NAVARRO FERNANDEZ, José y
GARCIA GARCIA, Vicente**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA GLICOFORMA BETA DE ANTITROMBINA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método para detectar y/o cuantificar la glicoforma beta de la antitrombina, a un método para el diagnóstico de una patología tromboembólica mediante la determinación de la glicoforma beta de la antitrombina.

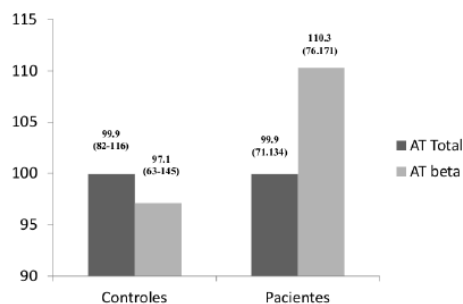


FIG.8

DESCRIPCIÓN

Método de cuantificación de la glicofoma beta de antitrombina.

Campo de la invención

5 La presente invención se encuadra fundamentalmente en el área de la hemostasia, siendo el principal sector de aplicación el sanitario con fines diagnósticos y pronósticos en hematología, cardiología, neurología, oncología, cirugía y ginecología. Es también aplicable a la investigación en modelos animales de cualquiera de estas enfermedades.

Estado de la técnica

10 La antitrombina es una serpina muy conservada en la escala filogenética que actúa como el anticoagulante endógeno más relevante en la hemostasia, como lo demuestra el hecho de que su deficiencia completa es letal, y la deficiencia parcial tanto adquirida como congénita incrementa de forma muy significativa el riesgo trombotico (Ishiguro y col. J Clin Invest. 2000;106:873-8).

15 La determinación de los niveles de antitrombina es una de las pruebas incluidas en los estudios de trombofilia que se aplican a pacientes con episodios tromboticos tempranos, recurrentes, con historia familiar o localización inusual (Heit JA. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007:127-35). Esta prueba se realiza habitualmente evaluando la actividad anticoagulante (anti-FXa o anti-IIa) del plasma mediante sistemas cromogénicos, aunque el estudio completo de la deficiencia de antitrombina implica determinación de niveles antigénicos, afinidad por heparina y análisis molecular (Cooper y col. Int J Lab Hematol. 2011 Mar 15; Patnaik y Moll. Haemophilia. 2008; 14:1229-39). Estos métodos detectan y definen la deficiencia congénita o adquirida de este potente anticoagulante, que se asocia con un elevado riesgo trombotico (OR: 10-50), aunque su incidencia en la población general es baja (Patnaik y Moll. Haemophilia. 2008; 14:1229-39).

25 Existen dos glicofomas de antitrombina en plasma. La glicofoma alfa, con 4 N-glicanos, es la mayoritaria (90-95%), mientras que la glicofoma beta, que carece de N-glicosilación en posición 135, es la minoritaria (5-10%). La generación de glicofoma beta se explica por la presencia de un residuo serina en posición 137, dentro de la secuencia consenso responsable de la N-glicosilación de la asparragina (N) 135. La presencia de serina en vez de treonina en posición 137 reduce la eficiencia del primer proceso de incorporación del núcleo glucídico al esqueleto proteico (Picard y col. Biochemistry 1995; 34:8433-40). La ausencia del componente glucídico en el residuo N135 tiene importantes consecuencias funcionales, ya que aumenta de dos a cinco veces la afinidad por heparina y otros glicosaminoglicanos como el heparán sulfato (Peterson & Blackburn. J Biol Chem 1985; 260: 610-5; McCoy y col. J Mol Biol. 2003; 326:823-33), proceso clave en la activación de la actividad anticoagulante de la antitrombina (Turk y col. Biochemistry 1997. 36:6682-91).

35 El papel fisiológico de la glicofoma beta de antitrombina no ha sido completamente definido, pero la mayor afinidad por heparina junto a diferentes estudios realizados en modelos animales de patología trombotica sugieren que la glicofoma beta de antitrombina es la que mayor potencial antitrombotico tiene, al menos en la superficie endotelial (Felch & Owen. Biochemistry 1994; 33:818-22; Witmer y cols Arterioscler Thromb 1991, 11:530-9; Frebelius y cols. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996;16:1292-7).

40 Estos datos sugieren que la glicofoma beta de antitrombina es el principal anticoagulante *in vivo* (Swedenborg J. Blood Coagul Fibrinolysis. 1998;9 Suppl 3:S7-10; McCoy y col. J Mol Biol. 2003;326:823-33) y por tanto, variaciones en los niveles de la glicofoma beta de antitrombina podrían tener relevancia en patología tromboembólica, arterial y venosa, así como en situaciones donde las complicaciones tromboticas son frecuentes como en pacientes con cáncer, cirugía, inmovilización, embarazo y parto, etc.

45 En este contexto, la cuantificación de los niveles de glicofoma beta en plasma es un objetivo relevante. El problema diagnóstico es que la cadena proteica es exactamente igual en las dos glicofomas de antitrombina, y los estudios funcionales no discriminan las dos glicofomas, por lo que un estudio global, prima a la forma mayoritaria (alfa). Por tanto, los estudios disponibles actualmente no detectan modificaciones incluso relevantes en los niveles de glicofoma beta. Estas limitaciones exigen el desarrollo de métodos capaces de identificar de forma específica la glicofoma beta de antitrombina.

Se han desarrollado diferentes métodos que permiten discriminar las dos glicofomas de antitrombina:

- 1) Métodos de isoelectroenfoque o que combinan sistemas de masas y cromatografía líquida de alta presión en capilar (IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS) (Plematl y col. Proteomics. 2005; 5:4025-33).
- 5 2) Espectrometría de masas (Kleinova y col. J Mass Spectrom. 2004; 39:1429-36), con diferentes aproximaciones como "on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-quadrupole ion trap-mass spectrometry" (Demelbauer y col. Electrophoresis. 2004; 25:2026-32).
- 3) Electroforesis en dos dimensiones y electroforesis capilar (Two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoresis) (Kremser y col. Electrophoresis. 2003; 24:4282-90).
- 10 4) Variaciones de cromatografía líquida (Hydroxyapatite high-performance liquid chromatography) (Karlsson y Winge. Protein Expr Purif. 2003;28:196-201).
- 5) Cromatografía de afinidad por heparina (Heparin affinity chromatography) (Heger y col. Thromb Res. 2002; 106:157-64).

15 En todos estos métodos se requiere disponer de proteína pura o grandes cantidades de plasma, precisan equipos muy costosos y especializados y suelen consumir mucho tiempo. Además, muchos de estos sistemas no son cuantitativos.

Existe por tanto una necesidad de disponer de métodos sencillos, baratos y rápidos capaces de cuantificar los niveles de glicofoma beta de antitrombina de pequeñas cantidades de muestras biológicas, especialmente plasma.

20 Existen múltiples patentes relacionadas con antitrombina, especialmente el uso clínico de concentrados de antitrombina purificada del plasma o recombinante, o de sustancias que potencien la actividad anticoagulante de esta molécula como heparinas o similares (<http://tgs.freshpatents.com/Antithrombin-lii-bx1.php>), pero no para la detección y/o cuantificación de la glicofoma beta.

Descripción de la invención

25 Así pues en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar y/o cuantificar glicofoma beta de la antitrombina que comprende:

- a) contactar la muestra aislada de un sujeto, con heparina y una sal en elevada concentración (1.1M), de tal forma que solo se activa la glicofoma beta de la antitrombina.
- b) cuantificación de la antitrombina activada

30 En una realización en particular de la presente invención, la heparina es no fraccionada, de bajo peso molecular o pentasacárido esencial.

En otra realización en particular de la presente invención, la sal es cloruro sódico.

En otra realización en particular de la presente invención el paso b) de cuantificación de la antitrombina activada se realiza mediante la determinación de la actividad inhibitoria de la antitrombina frente al factor Xa, IIa, IXa, o VIIa.

35 En una realización en particular, la muestra es plasma o un medio de cultivo.

En otra realización en particular, el plasma está anticoagulado con citrato o EDTA

En una realización en particular, la muestra de plasma es procedente de humanos o de ratón.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una patología tromboembólica que comprende el método para detectar y/o cuantificar la glicofoma beta de la antitrombina descrito anteriormente y posteriormente comparar los niveles obtenidos en el paso b) con niveles control, donde la presencia de niveles alterados de glicofoma beta de la antitrombina es indicativo de patología tromboembólica.

En la presente invención por patología tromboembólica nos referimos a cualquier patología tromboembólica producida por trombofilia, trombosis venosa, enfermedad periférica arterial, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, arteriosclerosis, embarazo y puerperio, cirugía o cáncer.

5 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la glicofoma beta de la antitrombina como marcador de enfermedad tromboembólica.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación de la glicofoma beta de la antitrombina mediante el método de detección y/o cuantificación descrito anteriormente que comprende:

- 10
- Solución salina
 - Heparina,
 - Al menos un factor de la coagulación de la sangre
 - Al menos un sustrato cromogénico

En una realización en particular, el kit comprende solución salina concentrada y diluida, heparina, factor FXa, plasma control y sustrato cromogénico S2765.

15 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso de dicho kit descrito en el cuarto aspecto de la presente invención, para la detección y/o cuantificación de la glicofoma beta de la antitrombina.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para diagnosticar una patología tromboembólica según el método de diagnóstico descrito anteriormente que comprende:

- 20
- Solución salina
 - Heparina,
 - Al menos un factor de la coagulación de la sangre
 - Al menos un sustrato cromogénico

25 En una realización en particular, el kit comprende solución salina concentrada y diluida, heparina, factor FXa, plasma control y sustrato cromogénico S2765. En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit descrito en el sexto aspecto de la invención, para el diagnóstico de patologías tromboembólicas.

Descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra la cinética de liberación de paranitroanilina causada por la acción proteolítica del FXa (0.25U) sobre el sustrato cromogénico S2765 (100 μ M), determinada por la absorbancia medida a una longitud de onda de 405nm. La figura refleja el efecto inhibitorio de las glicofomas alfa y beta de antitrombina purificada del plasma humano (5 μ M para ambas glicofomas) en presencia de heparina (0.6U) y concentraciones de NaCl restrictiva (1.1 M) o permisiva (15 mM) para la unión de heparina a la glicofoma alfa.

La figura 2 muestra la relación entre cantidad de glicofoma beta de antitrombina plasmática e inhibición de FXa en condiciones restrictivas (1.1 M NaCl).

35 La figura 3 muestra la purificación y caracterización de la glicofoma beta de antitrombina plasmática. A) Purificación de las principales formas de antitrombina del plasma mediante cromatografía de afinidad por heparina, en la que se refleja la mayor afinidad por heparina de la glicofoma beta y la elución de la misma empleando elevadas concentraciones de NaCl. La forma latente es una conformación inactiva con baja afinidad por heparina. B) Diferencia de tamaño de las glicofomas alfa y beta purificadas del plasma identificada mediante SDS-PAGE y tinción con plata (alfa: 58KD; beta: 56 KD). C) Identificación de las glicofomas alfa y beta de
40 antitrombina en plasma mediante isoelectroenfoque y electroelución (empleando el sistema *Agilent 3100 OFFGel fractionator* y tiras de 24 pocillos con gradiente de pH4-7), con posterior separación mediante SDS-PAGE e identificación de la molécula mediante western blot.

La figura 4: Glicofoma beta de antitrombina humana recombinante (r β AT) generada en células de riñón HEK-EBNA y purificada mediante cromatografía de afinidad por heparina y posterior cromatografía de intercambio iónico. Comparación con las glicofomas alfa y beta de antitrombina purificada de plasma de un sujeto sano en una electroforesis en geles de SDS y tinción con plata.

5 La figura 5 muestra la cinética de liberación de paranitroanilina generada por la acción proteolítica del FXa (0.25 U) sobre el sustrato cromogénico S2765 (100 μ M), determinada por la absorbancia medida a una longitud de onda de 405nm. La figura refleja el efecto inhibitorio de las glicofomas de antitrombina alfa plasmática (p- α) y beta recombinante (r- β) (5 μ M para ambas moléculas) en presencia de heparina (0.6 U) y concentraciones de NaCl restrictiva (1.1 M) para la unión de heparina a la glicofoma alfa.

10 La figura 6 muestra la cinética de liberación de paranitroanilina generada por la acción proteolítica del FXa (0.25 U) sobre el sustrato cromogénico S2765 (100 μ M) y determinada mediante absorbancia medida a una longitud de onda de 405nm. La figura refleja el efecto inhibitorio de diferentes diluciones de plasma citratado de dos sujetos sanos (A y B) en presencia de heparina (0.6 U) y concentraciones de NaCl restrictiva (1.1 M) o permisiva (15 mM) para la unión de heparina a la glicofoma alfa. Los valores de velocidad máxima (Vmax) de la reacción
15 en condiciones restrictivas (1.1 M) se indican en la línea inferior. (Bl: blanco)

La figura 7 muestra los niveles de glicofoma beta de antitrombina en el plasma anticoagulado con citrato o EDTA de 6 sujetos sanos (A-F). Los valores se representan en valores porcentuales al obtenido en un pool de plasma obtenido con muestras de 10 sujetos sanos. Bl: blanco.

20 La figura 8 muestra los niveles de antitrombina total y glicofoma beta en plasma citratado de 97 sujetos Caucásicos sanos y 108 pacientes con infarto cerebral en el evento agudo. Se muestra la media así como el rango de valores. Los valores se representan como % del valor observado en un pool de plasma citratado generado con 100 sujetos sanos no relacionados.

La figura 9 muestra los niveles de antitrombina total y glicofoma beta en plasma citratado de 4 ratones BalbC. Los valores se representan como % del valor observado en un pool de plasma citratado humano generado con
25 100 sujetos sanos no relacionados. (Bl: blanco, ratón 1: 150%, ratón 2: 134%)

Descripción detallada de la invención

Son objeto de la presente invención el método para la detección y/o cuantificación de la glicofoma beta de antitrombina presente en muestras biológicas.

30 La presente invención describe los fundamentos, el método para la detección y cuantificación de glicofoma beta de antitrombina en muestras biológicas y la validación experimental del mismo.

Así, la invención proporcionó un método para detectar y cuantificar la glicofoma beta de antitrombina humana o de otro animal con elevado grado de homología en plasma o medio de cultivo que contenga dicha glicofoma de antitrombina, el método comprendió las siguientes etapas:

35 i) se puso en contacto el fluido que contenía la antitrombina a cuantificar, con heparina en presencia de una concentración elevada de cloruro sódico (1.1 M), de tal forma que se impidió la unión de la heparina a la glicofoma mayoritaria de antitrombina (glicofoma alfa). De esta forma, sólo la glicofoma beta de antitrombina presente en la muestra problema se activó por heparina.

40 ii) se cuantificó la cantidad de antitrombina activada de la muestra mediante la determinación de la actividad inhibitoria anti-factor Xa de la muestra. Otras actividades inhibitorias de la antitrombina: anti-IIa, anti-IXa, anti-VIIa, etc. pueden ser evaluadas empleando este método. Para ello, se puso en contacto la muestra anterior con factor Xa o la diana que inhiba la antitrombina. La actividad residual de factor Xa o de la serín proteasa diana se determinó mediante un sistema cromogénico específico. Para ello, se puso en contacto la muestra anterior con S2765, para cuantificar actividad de FXa, y la liberación de paranitroanilina se cuantificó mediante medida de la absorbancia a 405nm de forma continua o a punto fijo. Para otras dianas de la antitrombina, como bien sabe un
45 experto en la materia, se emplearían sustratos cromogénicos específicos.

iii) la descripción de los resultados se estableció de forma arbitraria (OD), porcentual frente a una muestra de referencia, o en valores absolutos empleando en la recta patrón diferentes cantidades de glicofoma beta de antitrombina purificada.

5 Como bien sabe un experto en la materia, se puede emplear cualquier heparina de bajo peso molecular o pentasacárido esencial en concentraciones similares. Igualmente podrían emplearse sistemas alternativos al cromogénico como el fluorogénico.

Ejemplo 1: Purificación y verificación de las dos principales glicofomas de antitrombina humana

10 Las principales glicofomas de antitrombina presentes en el plasma de donantes de sangre sanos, las glicofomas alfa y beta se purificaron de 1 litro de plasma de donantes de sangre sanos mediante cromatografía de afinidad por heparina (McKay E.J. *Thromb Res.*1981; 21:375–382). La glicofoma beta tiene mayor afinidad por heparina (Figura 3A), tiene menor tamaño en geles de SDS (Figura 3B), que se ajusta a los datos bibliográficos cuando se evalúa mediante proteómica (alfa: 58KD; beta: 56 KD) (McCoy y col. *J Mol Biol.* 2003; 326:823-33). Además, presenta mayor punto isoeléctrico (alfa: 5.1-5.2; beta: 5.4) (Figura 3C).

15 *Purificación de glicofoma beta de antitrombina humana recombinante y verificación del método de detección y cuantificación con esta glicofoma.*

20 También empleamos glicofoma beta de antitrombina humana producida de forma recombinante mediante expresión transitoria del plásmido pCEP4-S137A/AT en la línea celular embrionaria de riñón HEK-EBNA. Esta forma se purificó mediante cromatografía de afinidad por heparina y posterior cromatografía de intercambio iónico. La verificación de que se trata de glicofoma beta fue mediante electroforesis, comparándola con las dos glicofomas de antitrombina purificadas del plasma (Figura 4). El método desarrollado para restringir la activación inducida por heparina a la forma beta se comprobó eficaz también para la forma beta recombinante de antitrombina (Figura 5).

Ejemplo 2: Validez del método para cuantificar los niveles de la glicofoma beta de antitrombina y su uso en muestras biológicas.

25 Una vez demostrada la validez del método desarrollado para identificar específicamente la actividad anticoagulante de la glicofoma beta de antitrombina, ajustamos las condiciones experimentales para aplicarlo a muestras biológicas. Para ello, empleamos diluciones seriadas del plasma citratado de sujetos sanos manteniendo las condiciones restrictivas de sal (NaCl 1.1 M final) que sólo permiten la activación de la glicofoma beta. Como se puede observar en la figura 6 se observa una correcta linealidad. La dilución más apropiada para
30 estudios posteriores se estableció en 1/30.

Validez del método para cuantificar los niveles de la glicofoma beta de antitrombina en plasma con diferentes anticoagulantes.

35 La figura 7 muestra que el método se puede emplear tanto en muestras de plasma anticoagulado con citrato como con EDTA. En la tabla 1 se muestran los niveles de glicofoma beta de antitrombina en el plasma anticoagulado con citrato y con EDTA en las 6 muestras de sujetos sanos.

MUESTRA	CITRATO (%)	EDTA (%)
A	124.9	121.4
B	98.8	103.4
C	109.6	105.6
D	133.1	128.3
E	80.9	89.3
F	131.6	98.3

Tabla 1

Ejemplo 3: Niveles de glicofoma beta de antitrombina en plasma citratado de una población sana y pacientes con patología tromboembólica.

5 La figura 8 muestra los niveles de antitrombina total y glicofoma beta detectados en el plasma citratado de 97 donantes de sangre, indicando el rango de niveles circulantes en población sana. Los valores se representan como porcentaje del resultado obtenido en un *pool* de plasma generado con 100 sujetos sanos no incluidos en el estudio individualizado. Esta misma figura muestra los mismos resultados para 108 pacientes con infarto cerebral durante el evento agudo. De acuerdo con nuestros resultados, los niveles circulantes de la glicofoma beta de antitrombina aumentan significativamente en estos pacientes ($p < 0.01$).

Validez del método para cuantificar los niveles de glicofoma beta de antitrombina en diferentes especies.

10 Para validar si el método desarrollado se puede emplear en muestras plasmáticas de otras especies, empleamos el método descrito y las mismas diluciones de plasma indicadas para humanos en muestras de plasma citratado de ratón. La figura 9 muestra los valores de antitrombina total y glicofoma beta detectada en dos ratones BalbC. Los valores se representan como % de los niveles detectados en un pool de plasma citratado humano. De acuerdo con estos resultados, los ratones parecen tener más glicofoma beta de antitrombina circulante que los
15 humanos

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar y/o cuantificar glicofoma beta de la antitrombina que comprende:
 - a) contactar la muestra aislada de un sujeto, con heparina y una sal en una concentración 1.1M, de tal forma que solo se activa la glicofoma beta de la antitrombina.
 - b) cuantificación de la antitrombina activada
2. Método según la reivindicación 1, donde la heparina es seleccionada de heparina de bajo peso molecular, heparina no fraccionada o pentasacárido esencial.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sal es cloruro sódico.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso b) de cuantificación de la antitrombina activada se realiza de mediante la determinación de la actividad inhibitoria de la antitrombina como son la actividad anti-factor Xa, anti-factor IIa, anti-factor IXa, anti-factor VIIa.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la muestra es sangre, plasma o medio de cultivo.
6. Método para diagnosticar una patología tromboembólica que comprende el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y posteriormente comparar los niveles obtenidos en el paso b) con niveles control, donde la presencia de niveles alterados de glicofoma beta de la antitrombina es indicativo de patología tromboembólica.
7. Método según la reivindicación 6, donde la patología tromboembólica es producida por trombofilia, trombosis venosa, enfermedad periférica arterial, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, arteriosclerosis, embarazo y puerperio, cirugía o cáncer.
8. Uso de la glicofoma beta de la antitrombina como marcador de enfermedad tromboembólica.
9. Kit para la detección y/o cuantificación de la glicofoma beta de la antitrombina según el método de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque comprende:
 - Solución salina
 - Heparina,
 - Al menos un factor de la coagulación de la sangre
 - Al menos un sustrato cromogénico
10. Kit para diagnosticar una patología tromboembólica según el método de las reivindicaciones 6-7, caracterizado porque comprende:
 - Solución salina
 - Heparina,
 - Al menos un factor de la coagulación de la sangre
 - Al menos un sustrato cromogénico
11. Uso del kit según la reivindicación 9 para la detección y/o cuantificación de la glicofoma beta de la antitrombina.
12. Uso del kit según la reivindicación 10, para diagnosticar una patología tromboembólica.

FIG.1

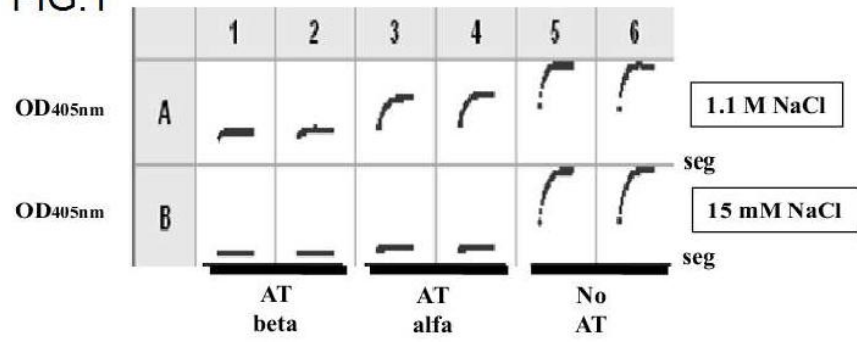


FIG.2

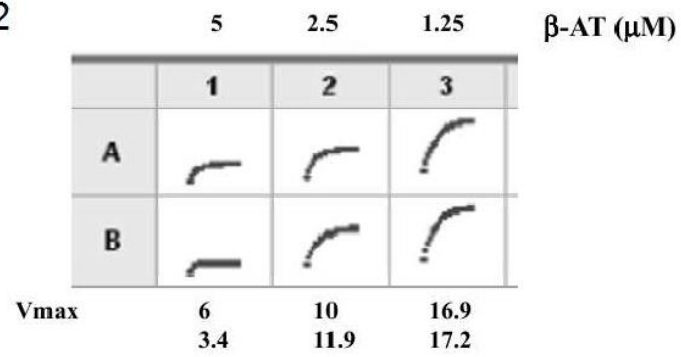
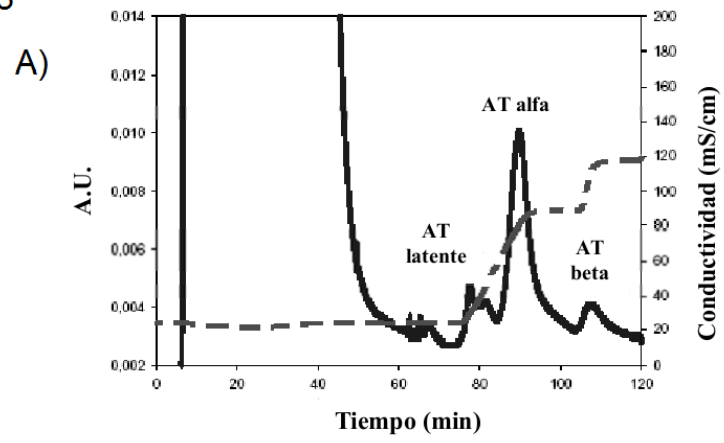
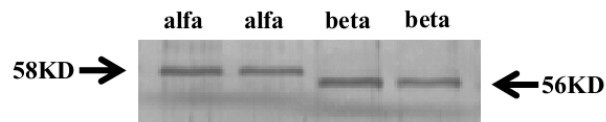


FIG.3



B)



C)

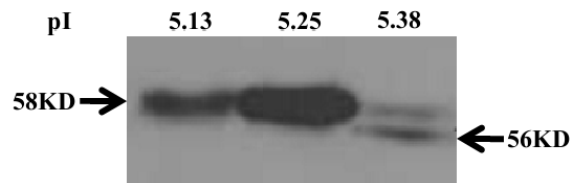


FIG.4

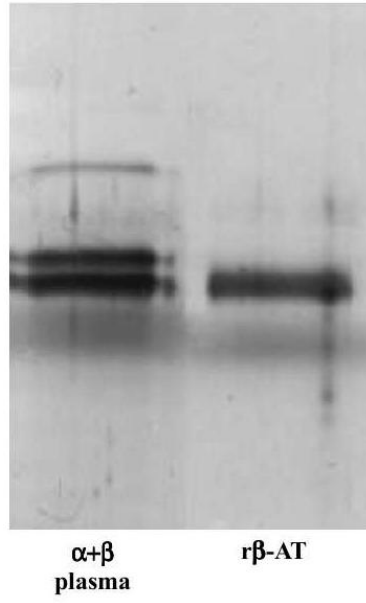
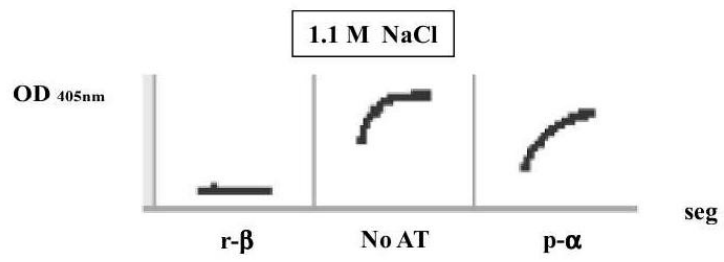


FIG.5



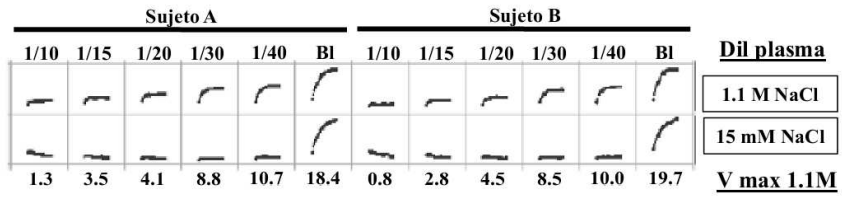


FIG.6

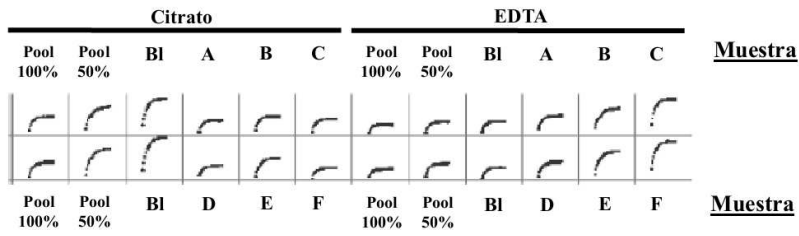


FIG.7

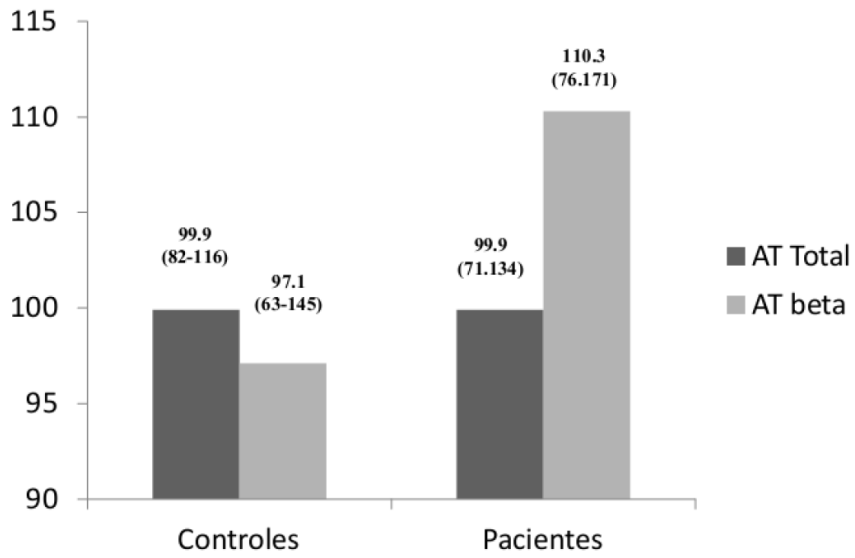


FIG.8

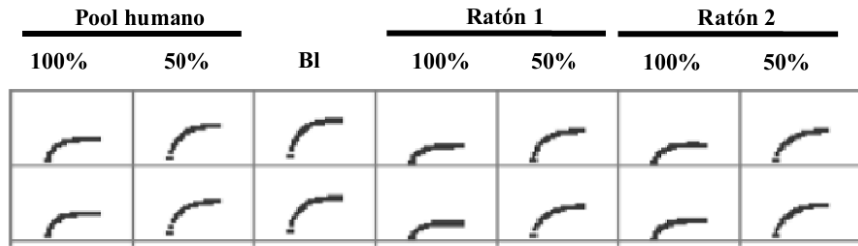


FIG.9