

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 797**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2008** **E 11002342 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013** **EP 2388596**

54 Título: **Métodos para la determinación de la actividad de escisión del factor de von Willebrand de la proteasa ADAMTS-13**

30 Prioridad:

**06.07.2007 DE 102007031708**

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

**17.10.2013**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**ALTHAUS, HARALD;  
OBSER, TOBIAS;  
PATZKE, JÜRGEN, DR. y  
SCHNEPPENHEIM, REINHARD PROF.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 425 797 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para la determinación de la actividad de escisión del factor de von Willebrand de la proteasa ADAMTS-13

La invención se encuentra en el campo de la diagnosis de coagulación y se refiere a un método para determinar la actividad de escisión del factor de von Willebrand (VWF) de la proteasa ADAMTS-13.

5 ADAMTS-13 ("a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs", o una desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina) es una metaloproteasa que escinde el factor de von Willebrand (VWF) de modo proteolítico y de esta manera reduce su actividad. Se conocen deficiencias congénitas y heredadas de la actividad enzimática de ADAMTS-13, las cuales causan diversas enfermedades como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), una patología tromboembólica peligrosa para la vida que afecta a la microcirculación. En el plasma  
10 de pacientes con PTT se encuentran multímeros del VWF extraordinariamente grandes, y se consideran una causa para la formación de trombos ricos en VWF y trombocitos. La determinación de la actividad de proteasa que escinde VWF de la proteasa ADAMTS-13 en muestras de pacientes es, por lo tanto, de importancia diagnóstica.

En el estado de la técnica se conocen diferentes métodos para determinar la actividad de escisión de VWF de la proteasa ADAMTS-13 o para diagnóstico de una deficiencia de ADAMTS-13:

15 Furlan et al. (1996) describen un método en el que la muestra que contiene la proteasa ADAMTS-13 se incuba con VWF humano purificado en calidad de sustrato, y en cuyo caso la detección de la actividad proteolítica de la proteasa de ADAMTS-13 se efectúa mediante un análisis multimérico de VWF posterior, mediante una electroforesis en gel de agarosa- SDS, o mediante un análisis de un fragmento de VWF mediante electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) e inmunoblotting posterior [Furlan, M., Robles, R. and Lämmle, B. (1996) Partial  
20 purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis (Purificación y caracterización parciales de una proteasa del plasma humano que escinde el factor de von Willebrand en fragmentos producidos por proteólisis in vivo). Blood 87, 10: 4223-4234]. Análisis multiméricos de este tipo mediante electroforesis en gel son extremadamente costosos en trabajo y tiempo, y por lo tanto no son adecuados para su empleo en un laboratorio clínico.

25 Otros métodos de ensayo funcionales determinan la actividad proteolítica de la proteasa ADAMTS-13, incubando la muestra que contiene la proteasa ADAMTS-13 con VWF como sustrato, y a continuación se determina la pérdida de actividad del sustrato VWF. Cuanto más proteasa de ADAMTS-13 está contenida en la muestra, más sustrato VWF se escinde y menor actividad de VWF puede detectarse después en la mezcla de reacción. La ventaja de estos  
30 métodos funcionales consiste en que utilizando el VWF como sustrato y midiendo la pérdida de función de los multímeros grandes se simula la función relevante in vivo de la proteasa ADAMTS-13 in vitro.

La patente WO 2004/005451 A2 revela un método en el que una muestra que contiene la proteasa de ADAMTS-13 se incuba con VWF humano purificado como sustrato, y en cuyo caso la detección de la actividad proteolítica de la proteasa ADAMTS-13 se efectúa mediante una determinación posterior de la actividad de VWF que queda en la  
35 mezcla de reacción, mediante un ensayo de cofactor de ristocetina. De modo alternativo, la actividad de VWF que queda en la mezcla de reacción se efectúa por medio de un ensayo de enlace de colágeno (véase por ejemplo WO 00/50904). La desventaja es que la mezcla de reacción tiene que incubarse durante mucho tiempo, en parte durante una noche con el fin de producir una degradación proteolítica suficiente del VWF. Un método mejorado en el que el tiempo de incubación se reduce a 60 minutos está descrito en Kostousov, V., Fehr, J., Bombeli, T. (2006) Novel,  
40 semiautomated, 60-min-assay to determine von Willebrand factor cleaving activity of ADAMTS-13 (Ensayos de 60 minutos semiautomáticos novedosos para determinar actividad de escisión de factor de von Willebrand de ADAMTS-13). Thrombosis Res. 118: 723-731.

Las patentes estadounidenses US 2007/0065895 A1 y US 2005/0186646 A1 revelan métodos en los que una muestra que contiene la proteasa ADAMTS-13 se incuba con péptidos que tienen un sitio de corte o escisión  
45 específico para la proteasa ADAMTS-13, o se incuban péptidos VWF (partes) en calidad de sustrato, y en cuyo caso la detección de la actividad proteolítica de la proteasa ADAMTS-13 se efectúa mediante un análisis posterior de los fragmentos de péptido resultantes por medio de SDS-PAGE y de manera opcional mediante inmunoblotting posterior.

Las desventajas de los sistemas de ensayo consisten en que, o bien son muy complicados desde el punto de vista  
50 técnico como, por ejemplo, el análisis de los fragmentos de sustrato resultantes de la proteólisis mediante SDS-PAGE, o bien en que no utilizan el sustrato natural de VWF, por lo cual algunas disfuncionalidades de la proteasa ADAMTS-13 pueden posiblemente no reconocerse.

El objeto fundamental de la presente invención era proporcionar un método para determinar la actividad de escisión del factor de von Willebrand de la proteasa ADAMTS-13 que haga posible detectar tantas disfuncionalidades de la

proteasa ADAMTS-13 como sean posibles con el método, y el cual pueda realizarse con ahorro de tiempo y de modo automático en aparatos de análisis clínicos convencionales.

El objeto se resuelve mezclando una muestra que presumiblemente contiene la proteasa ADAMTS-13, con VWF aislado como sustrato para producir una mezcla de reacción, en cuyo caso el sustrato de VWF se compone de VWF multimérico de alto peso molecular que contiene monómeros VWF que tienen al menos una variación de secuencia de aminoácido (polimorfismo o mutación), lo que respectivamente lleva a que el sustrato de VWF, comparado con un sustrato de VWF que se compone de VWF multimérico, de alto peso molecular de monómeros VWF de tipo silvestre, conduzca a una degradación acelerada por ADAMTS-13.

El monómero VWF humano se sintetiza primero in vivo como proteína precursora de 2813 aminoácidos de longitud. Mediante procesamiento intracelular se generan multímeros VWF que pueden volverse de más de 20 000 kDa de tamaño. Estos multímeros se componen de monómeros VWF de 2050 aminoácidos de longitud, enlazados entre sí por puentes de disulfuro, dispuestos linealmente. En el plasma circula el VWF en forma globular de multímeros con diferente tamaño, de aproximadamente 500 kDa (dímero) a más de 15 000 kDa de tamaño.

Por un "sustrato VWF multimérico de alto peso molecular" debe entenderse, en relación con la presente invención, una proteína VWF que se compone de más de 10 moléculas VWF dimerizadas y que es mayor a 5000 kDa, lo cual puede establecerse mediante métodos de electroforesis en gel conocidos por el especialista. Además, el VWF multimérico de alto peso molecular contiene monómeros VWF, que tienen al menos una variación de secuencia de aminoácido la cual lleva respectivamente a que el sustrato de VWF – en comparación con un sustrato de VWF que se compone de VWF multimérico de alto peso molecular de monómeros de VWF de tipo silvestre – conduzca a una degradación acelerada mediante ADAMTS-13.

Las variaciones de secuencia de aminoácido de la proteína de VWF, las cuales elevan la susceptibilidad del VWF por un corte proteolítico mediante la proteasa ADAMTS-13, pertenecen al estado de la técnica [véase, por ejemplo, Hassenpflug, W.A., Budde, U., Obser, T., Angerhaus, D., Drewke, E., Schneppenheim, S., Schneppenheim, R. (2006) Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis (Impacto de mutaciones en el dominio de factor de von Willebrand A2 en la proteólisis dependiente de ADAMTS13). Blood 107: 2339-2345 o Rayes, J., Hommais, A., Legendre, P., Tout, H., Veyradier, A., Obert, B., Ribba, A.S., Girma, J.P. (2006) Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility of von Willebrand factor to ADAMTS-13 (Efecto de enfermedad de von Willebrand tipo 2B y mutaciones tipo 2M sobre la susceptibilidad de von Willebrand factor a ADAMTS-13). J Thromb Haemost. 5: 321-328]. Para la presente invención es principalmente adecuado un sustrato VWF que se compone de VWF multimérico de alto peso molecular, el cual contiene monómeros VWF que tienen al menos una variación de secuencia de aminoácido del siguiente grupo:

P1648S, E1638K, G1505R, S1506L, M1528V, R1569del, R1597W, V1607D, G1609R, G1629E, G1631D, R1597Q, V1499E y Y1584C.

El dato de la posición de aminoácido hace referencia a la secuencia de aminoácidos de 2813 de aminoácidos de largo, de la proteína precursora del VWF (véase, por ejemplo, NCBI No. de acceso AAB59458, Versión AA59458.1, GI: 340356). La abreviatura "dei" significa una supresión del residuo de aminoácido concernido. Para la nomenclatura de mutaciones y polimorfismos del factor de von Willebrand véase también Goodeve, A.C., Eikenboom, J.C.J., Ginsburg, D., Hilbert, L., Mazurier, C., Peake, I.R., Sadler, J.E. and Rodeghiero, F. (2001) A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms (Una nomenclatura estándar para mutaciones de gen de factor de von Willebrand y polimorfismos). Thromb Haemost. 85: 929-931.

Otras variaciones de secuencia de aminoácido del VWF, de origen natural o generadas artificialmente también pueden ser adecuadas, en tanto que ellas llevan respectivamente a que el sustrato de VWF resultante – comparado con un sustrato de VWF compuesto de VWF multimérico de alto peso molecular de monómeros de VWF de tipo silvestre – conduzca a una degradación acelerada mediante ADAMTS-13, es decir que el sustrato de VWF resultante tiene una susceptibilidad incrementada por proteólisis de ADAMTS-13. Una susceptibilidad incrementada por proteólisis de ADAMTS-13 se presenta cuando el sustrato de VWF multimérico de alto peso molecular se degrada proteolíticamente in vitro más rápido mediante ADAMTS-13, que un sustrato de VWF multimérico de alto peso molecular de tipo silvestre, es decir, cuando en condiciones iguales de incubación se produce una fragmentación más fuerte del sustrato de VWF, la cual puede establecerse, por ejemplo, mediante un método de electroforesis en gel conocido por un experto en la técnica.

El sustrato de VWF multimérico de alto peso molecular aislado a ser utilizado en el método de la invención, puede obtenerse bien a partir de plasmas del donante de soportes heterocigóticos u homocigóticos de una variación de secuencia de aminoácido – VWF adecuada, o bien puede expresarse de modo recombinante con ayuda del método conocido por el experto en la técnica. El sustrato de VWF producido de modo recombinante tiene las ventajas de que no presenta contaminación de ADAMTS-13 de ningún tipo, la cual al transmitirse a la mezcla de ensayo podría conducir a un falseamiento de los resultados del ensayo, en cuanto a que está completamente multimerizado y a que no está proteolizado, lo cual puede ser el caso en el VWF aislado del plasma.

En una modalidad preferente del método de la invención para determinar la actividad de escisión del factor de von Willebrand (VWF) de la proteasa ADAMTS-13, se puede acelerar la degradación del sustrato VWF adicionalmente mezclando la muestra además con heparina.

5 La determinación de la actividad de VWF que queda después de la incubación de la muestra con el sustrato VWF en la mezcla de reacción se efectúa, según la invención, mezclando la mezcla de reacción o una alícuota de la misma con proteína GPIIb $\alpha$  aislada, la cual comprende una secuencia de aminoácido que tiene, en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO:1), al menos los residuos de aminoácido 1-268, y en las posiciones 233 y 239 tiene respectivamente una sustitución de aminoácido Xaa (preferentemente Xaa = residuo de valina o serina) y no tiene agregada ristocetina ni botrocetina.

10 Las sustituciones Xaa del residuo de glicina en la posición 233 y del residuo de metionina en la posición 239 de la cadena GPIIb $\alpha$ , se componen, de manera preferente, de un residuo de valina (G233V o M239V) o un residuo de serina (G233S o M239S). Es posible una combinación cualquiera de las diferentes sustituciones Xaa en ambas posiciones.

15 A la mezcla de ensayo no se adiciona, preferentemente, una "sustancia equivalente de ristocetina o botrocetina". Por el término "sustancia equivalente de ristocetina o botrocetina" se entiende en el contexto de la presente invención una sustancia exógena, es decir no fisiológica, que está en capacidad de inducir un enlace in vitro de VWF disuelto, a la cadena GPIIb $\alpha$  típica silvestre o fragmentos de la misma.

20 La cadena GPIIb $\alpha$  utilizada en el método de la invención puede ser una proteína de GPIIb $\alpha$  producida de modo recombinante o sintética. Para producir proteína de GPIIb $\alpha$  recombinante son adecuados sistemas de expresión procariotas o eucariotas conocidos, como, por ejemplo, la expresión en bacterias (por ejemplo E. coli), en levaduras (por ejemplo Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris), en cultivos celulares vegetales, animales o humanos. Para producir proteína de GPIIb $\alpha$  sintética son adecuadas técnicas conocidas para la síntesis de proteínas in vitro, como, por ejemplo, síntesis de fase sólida (por ejemplo, síntesis de Merrifield). De manera preferente, la proteína de GPIIb $\alpha$  utilizada en el método de la invención es una proteína de GPIIb $\alpha$  producida de modo recombinante, la cual se produjo en un cultivo de células humanas, de manera preferente en un cultivo de células de riñón embrionarias humanas (células de HEK).

30 La proteína de GPIIb $\alpha$  utilizada en el método de la invención puede fusionarse en el N terminal con la secuencia señal de GPIIb $\alpha$  homóloga humana MLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO: 2, también denominada como residuos de aminoácido -16 a -1). De modo alternativo, la proteína de GPIIb $\alpha$  utilizada puede estar fusionada en el extremo N terminal con una secuencia señal heteróloga, es decir con un polipéptido que usualmente no está presente en el polipéptido de GPIIb $\alpha$  humano, pero que influye positivamente en el sistema de expresión seleccionada a la expresión y/o la secreción de la proteína de GPIIb $\alpha$  expresada de modo recombinante. Una secuencia señal heteróloga adecuada es, por ejemplo, MPLQLLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRR (SEQ ID NO: 3).

35 Además, la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada en el método de la invención puede fusionarse en el C terminal a una o varias etiquetas (tags) de afinidad que hacen posible, por ejemplo, que la proteína expresada de modo recombinante se enlace a un soporte de afinidad, permitiendo de esta manera, por ejemplo, que la proteína GPIIb $\alpha$  expresada de modo recombinante se purifique, o incluso que la proteína GPIIb $\alpha$  recombinante se enlace con una fase sólida. Se da preferencia a pequeñas etiquetas (tags) de afinidad que tienen una longitud de no más de 12 aminoácidos. Particular preferencia se da a etiquetas (tags) de afinidad del grupo constituido por His-tag, Flag-tag, Arg-tag, c-Myc-tag y Strep-tag. Soportes de afinidad adecuados que se enlazan con alta afinidad a un tag de afinidad son, por ejemplo, anticuerpos específicos, cationes inmovilizados (por ejemplo Ni<sup>2+</sup> con afinidad por His-tags) u otros tipos de parejas de enlazamiento (por ejemplo, estreptavidina con afinidad por Strep-tags).

45 En una modalidad del método de la invención, la proteína GPIIb $\alpha$  está asociada con una fase sólida. El término "asociada" debe entenderse de un modo amplio y comprende, por ejemplo, un enlace covalente y no covalente, un enlace directo y uno indirecto, adsorción a una superficie e inclusión en una cavidad. En el caso de un enlace covalente, la proteína GPIIb $\alpha$  aislada se enlaza por medio de un enlace químico a la fase sólida. Un ejemplo de enlace no covalente es la adsorción superficial. Además de un enlace directo a la fase sólida, la proteína GPIIb $\alpha$  aislada también puede estar enlazada indirectamente por medio de una interacción específica con otras parejas de enlazamiento específicas con la fase sólida, por ejemplo mediante una interacción específica con un anticuerpo, de manera preferente con un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  o – si la proteína GPIIb $\alpha$  aislada tiene una etiqueta o tag de afinidad – con un anticuerpo de anti-etiqueta de afinidad.

55 El término "fase sólida" en el sentido de la invención incluye un objeto que se compone de material hidrofóbico, poroso y/o no poroso, y puede tener las formas más diversas como, por ejemplo, envase, tubo, placa de microtitulación (placa ELISA), esfera, micropartícula, varilla, tiras, papel filtro o de cromatografía, etc. Por lo general, la superficie de la fase sólida es hidrófila o puede hacerse hidrófila. La fase sólida puede componerse de los materiales más diversos como, por ejemplo, de materiales inorgánicos y/u orgánicos, de materiales sintéticos, de procedencia natural y/o de materiales modificados de procedencia natural. Ejemplos de materiales de la fase sólida

son polímeros como, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), moléculas de dextrano reticuladas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nailon; látex, cerámica, vidrio; metales, principalmente metales nobles como oro y plata; magnetita, mezclas o combinaciones de los mismos.

5 La fase sólida puede tener un recubrimiento de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, carbohidratos, sustancias lipofílicas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de los mismos, por ejemplo para suprimir o prevenir enlaces no específicos de componentes de la mezcla con la fase sólida o, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de suspensión de las fases sólidas en forma de partículas, la estabilidad al almacenamiento, la estabilidad de diseño o la resistencia a la luz UV, microbios u otros agentes destructivos.

10 Particularmente preferente es la proteína GPIIb $\alpha$  previamente mencionada acoplada a una fase sólida en forma de partículas, la cual se aglutina dependiendo de la actividad de VWF que queda. Por medio de la reacción de aglutinación puede determinarse la actividad de VWF residual en la mezcla de reacción, que a su vez da información sobre la actividad de ADAMTS-13 contenida en la muestra.

15 Una modalidad preferente del método para determinar la actividad del VWF, comprende el uso de una proteína GPIIb $\alpha$  asociada a partículas, de manera preferente una proteína GPIIb $\alpha$  asociada a partículas de látex, y la determinación de la actividad de VWF por medio de aglutinación mediada por GPIIb $\alpha$  de la fase sólida en forma de partículas. Preferentemente, se utiliza una proteína GPIIb $\alpha$  asociada a través de un anticuerpo con la fase sólida en forma de partículas. Para este propósito son adecuados anticuerpos anti- GPIIb $\alpha$ , principalmente los anticuerpos monoclonales VM16d [Mazurov, A.V. et al. (1991) Characterization of an antiglycoprotein Ib monoclonal antibody that specifically inhibits platelet-thrombin interaction (Caracterización de un anticuerpo monoclonal de antiglicoproteína Ib que específicamente inhibe interacción de trombina –plaqueta). Thromb Res. 62(6), 673-684; comercialmente disponible, por ejemplo, de Sanbio B.V., Uden, Holanda: número de producto MON 1146] y SZ-2 [Ruan, C. et al. (1987) A murine antiglycoprotein Ib complex monoclonal antibody, SZ 2, inhibits platelet aggregation induced by both ristocetin and collagen (Un anticuerpo monoclonal complejo de antiglicoproteína Ib de murino, SZ2, inhibe agregación de plaquetas inducida tanto por ristocetina como colágeno). Blood 69(2), 570-577; disponible comercialmente, por ejemplo, de Beckman Coulter Inc., Fullerton, Estados Unidos: número de producto IM0409]. Si la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está fusionada con una o varias etiquetas Flag-tags en el C terminal, igualmente es adecuado un anticuerpo anti-Flag [véase, por ejemplo, US 5,011,912; disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania]. Para la determinación cuantitativa de la reacción de aglutinación que se correlaciona con la cantidad o la actividad del VWF presente en la muestra, puede utilizarse, por ejemplo, la dispersión de luz en los agregados de partículas mediante la medición de intensidad de luz dispersa (nefelometría) o mediante la medición de la turbidez del medio (turbidimetría).

20 La determinación de la actividad del VWF se realiza, de manera preferente, por medio de la aglutinación mediada por GPIIb $\alpha$  de una fase sólida en forma de partículas en presencia de un detergente, preferentemente en presencia de un detergente del grupo de Tween® 20, Thesit, detergente Triton (por ejemplo Triton X-100® o Triton X-405®) y dodecilsulfato de sodio (SDS). Se encontró que la presencia de un detergente influye en la tasa de aglutinación, dependiente del VWF, de la fase sólida en forma de partículas, principalmente de partículas de látex.

25 La tasa de aglutinación se determinó en diferentes concentraciones de VWF y en concentraciones crecientes de Tween® 20 (véase la Figura 4, determinación de modo análogo al ejemplo 5). Es obvio que hay un refuerzo particularmente pronunciado de la reacción a concentraciones relativamente bajas de Tween® 20 (0,02-0,1 g/L), el cual disminuye de nuevo incrementando la concentración de Tween® 20 y se logra un nivel estable de refuerzo. De esta manera, por ejemplo, para un VWF de 149,6 % se logra un nivel de refuerzo estable a aproximadamente 1 g/L Tween® 20, y el esfuerzo entonces es de 85 % del valor de partida sin Tween® 20. Si se utiliza Tween® 20 como detergente existen por lo tanto dos posibilidades. Por una parte, Tween® 20 puede ajustarse a bajas concentraciones (0,02-0,1 g/L) con el fin de reforzar determinadas concentraciones de VWF de hasta 20 %, de modo particularmente vigoroso. De esta manera se obtiene, por ejemplo a Tween® 20 de 0,05 g/L (en la mezcla de ensayo) un refuerzo de la tasa de aglutinación en un 216 % a un VWF de 30,4 %. Puesto que las bajas concentraciones de VWF son particularmente difíciles de determinar, un refuerzo de la reacción es aquí de mucha ayuda. Por otra parte, un sistema de medición es en general más estable si opera en el rango de saturación del detergente para todas las concentraciones relevantes de VWF. Esto sería el caso, por ejemplo, desde Tween® 20 de 1 g/L. Esta variante es más adecuada para un ensayo de cribado (screening) para un amplio espectro de concentraciones de VWF. Concentraciones de Tween® 20 de 0,6-20,0 g/L, preferentemente de 1 g/L, son ventajosas si hay que reforzar la reacción de aglutinación al determinar concentraciones de VWF de más de 20 %.

30 Otros detergentes, como Thesit (sinónimo: Polidocanol, Schärer & Schlöpfer Ltd., Rothrist, Suiza), detergente Triton (por ejemplo Triton X-100® o Triton X-405®) y dodecilsulfato de sodio (SDS), muestran un incremento continuo dependiente de la concentración del refuerzo de la reacción de aglutinación (véase Figura 5, determinación de modo análogo al ejemplo 5: 45  $\mu$ L de muestra aunque con Thesit en lugar de Tween® 20).

Además, resulta preferente la determinación de la actividad de VWF por medio de la aglutinación mediada por GPIIb de una fase sólida en forma de partículas en presencia de polivinilpirrolidona (PVP), preferiblemente a una concentración de polivinilpirrolidona de 0,1 % a 1,0 % en la mezcla de ensayo y/o en presencia de Dextran T500, de manera preferente a una concentración de Dextran T500 de 0,1 % a 3 % en la sustancia de ensayo y/o en presencia de alginato 500-600 cP, preferentemente a una concentración de alginato 500-600 cP de 0,01 % a 0,2 % en la mezcla de ensayo.

Otra modalidad preferente del método de la invención para determinar la actividad de VWF es un formato de ensayo competitivo. El método comprende el uso de anticuerpos anti- GPIIb asociados a partículas, preferentemente VM16d, y del VWF asociado a partículas en una mezcla de reacción y la adición de proteína GPIIb. En presencia de la proteína GPIIb y en ausencia de ristocetina, botrocetina o una sustancia equivalente, se aglutinan las partículas. La adición de una muestra que contiene VWF inhibe esta reacción de aglutinación. La inhibición de la reacción de aglutinación se correlaciona con la cantidad o la actividad del VWF presente en la muestra.

Otra modalidad preferente del método para determinar la actividad de VWF comprende el uso de una fase sólida asociada, no en forma de partículas, preferentemente de una proteína GPIIb asociada a la superficie de una placa de microtitulación y la determinación de la actividad de VWF por medio de la determinación de la cantidad de VWF que se enlazó a la proteína GPIIb. De manera preferente, se utiliza una proteína GPIIb asociada a la fase sólida, no particulada, por medio de un anticuerpo. Para este propósito son adecuados anticuerpos anti-GPIIb, principalmente los anticuerpos monoclonales VM16d (véase más arriba) y MB45 [véase por ejemplo Modderman, P.W. et al. (1992) Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. J. Biol. Chem. 267(1), 364-369 y la referencia 26 allí citada; comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sanquin, Amsterdam Holanda: PeliCluster CD42b, número de producto M9142]. Si la Proteína GPIIb usada se fusiona en el C terminal con una o varias etiquetas Flag-tags, es igualmente adecuado un anticuerpo anti-Flag [véase más arriba]. Para determinar la cantidad de VWF que se unió a la proteína GPIIb puede utilizarse, por ejemplo, un anticuerpo anti-VWF, el cual está asociado directa o indirectamente con un componente de un sistema formador de señal, y con esto permite la cuantificación de la cantidad de VWF enlazada con GPIIb. Puesto que solo el VWF "activo" (intacto funcionalmente) se enlaza al receptor de GPIIb, la concentración de antígeno de VWF determinada se correlaciona con la actividad de VWF.

Una ventaja particular del método de la invención para determinar la actividad de escisión del factor de von Willebrand (VWF) de la proteasa ADAMTS-13 en una muestra, consiste en que puede prescindirse de un tratamiento con urea del sustrato de VWF, cuya aplicación está enlazada con el riesgo de determinar a continuación actividades demasiado bajas de VWF, si los tiempos de incubación durante el pre-tratamiento no se mantienen estrictos. En los diversos métodos del estado de la técnica es necesario el pretratamiento del sustrato de VWF con urea o sustancias con un efecto desnaturizador similar, con el fin de hacer accesible el VWF a la degradación por parte de la proteasa ADAMTS-13 (véase, por ejemplo, WO 2004/005451 A2).

Puesto que en cada muestra de plasma humano en la que debe determinarse la actividad de escisión de VWF de la proteasa ADAMTS-13 se encuentra contenido VWF de modo intrínseco a la muestra, es ventajoso realizar en paralelo a la mezcla de ensayo una medición de una segunda mezcla de ensayo, en la que una segunda alícuota de la misma muestra se analiza con ayuda del método de la invención, aunque sin que la prueba mezclada con el sustrato de VWF se incuba por el mismo lapso de tiempo que la propia mezcla de ensayo, sino que en tal caso inmediatamente después de mezclar la muestra y el sustrato de VWF se mide la actividad de VWF en la segunda mezcla de ensayo. La diferencia entre la actividad de VWF en la segunda mezcla de ensayo (sin el paso de incubación) y la actividad de VWF en la propia mezcla de ensayo (con paso de incubación hacia la degradación proteolítica de VWF) da como resultado a continuación la actividad de VWF degradada en la propia mezcla de ensayo por parte de ADAMTS-13.

Descripción de las figuras

Figura 1

El diseño de los sistemas de ensayo GPIIb (aa1-285, G233V/M239V) o GPIIb-ELISA de tipo silvestre aquí aplicados para determinar el VWF se indica en el ejemplo 4. Se emplearon 4 diluciones diferentes del VWF/concentrado de factor VIII Haemate® como muestra. En ausencia de ristocetina (0 mg/mL) al utilizar el GPIIb- (aa1-285,G233V/M239V) mutante se efectúa un enlace, fuerte y dependiente de la concentración, de VWF (parte superior de la figura). Al añadir ristocetina, este enlace puede incrementarse ligeramente lo cual se atribuye probablemente a un enlace no específico que también tiene lugar sin GPIIb. Por el contrario, un enlace de VWF de fuerza similar puede lograrse en el caso de la GPIIb de tipo silvestre solamente adicionando ristocetina de 1,2 mg/mL. Sin la adición de ristocetina al utilizar GPIIb de tipo silvestre no tiene lugar un enlace en absoluto (parte inferior de la figura).

Figura 2

Curva de calibración para determinar la actividad de VWF (actividad de VWF de 10 % - 200 %) y muestras de plasma citrato humano por medio de un ensayo de aglutinación de partículas de látex-GPIIb sin ristocetina (véase ejemplo 5). Representación de la velocidad de reacción de la aglutinación de las partículas dependiendo de la actividad de VWF.

5 Figura 3

Curva de calibración para determinar actividades bajas de VWF (actividad de VWF  $\geq$  3 %) en muestras de plasma citrato humano por medio de un ensayo de aglutinación de partículas de látex-GPIIb sin ristocetina (véase ejemplo 5, muestra de 45  $\mu$ L). Representación de la velocidad de reacción de la aglutinación de las partículas dependiendo de la actividad de VWF.

10 Figura 4

Ensayos de aglutinación de partículas de látex - GPIIb sin ristocetina en muestras con diferente concentración de VWF (14,9 % a 149,6 %) y en presencia de diversas concentraciones de Tween® 20 en la mezcla de ensayo (véase ejemplo 5, variación de la concentración de Tween® 20, muestra de 15  $\mu$ L).

Figura 5

15 Ensayos de aglutinación de partículas de látex-GPIIb sin ristocetina en muestras con diferente concentración de VWF (8 % a 40 %) y en presencia de diferentes concentraciones de Thesit en la mezcla de ensayo (véase ejemplo 5, aunque Thesit en lugar de Tween® 20, muestra de 45  $\mu$ L).

Figura 6

20 Ensayos de aglutinación de partículas de látex-GPIIb sin ristocetina en muestras con diferente concentración de VWF, que fueron diluidos previamente con plasma deficiente de VWF o con solución tampón, y en presencia de diversas concentraciones de Thesit en la mezcla de ensayo (véase ejemplo 5, aunque Thesit en lugar de Tween® 20, muestra de 45  $\mu$ L).

Los ejemplos descritos a continuación sirven como ilustración a modo de ejemplo de aspectos individuales de esta invención y no han de entenderse como una restricción.

25 **Ejemplos**

**Ejemplo 1: Clonación del constructo GPIIb-(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6XHis)**

30 El vector de expresión pIRES neo2 (BD Biosciences, Clontech, Art.-Nr.: 6938-1) se modificó de tal modo que entre el sitio de corte de restricción EcoRI y NotI contenía una etiqueta 3XFlag-tag y una etiqueta 6xHis-tag. En dirección previa (5') a las secuencias de la etiqueta se insertó un fragmento codificante para el péptido de señal (SEQ ID NO: 2) y los aminoácidos 1-285 del receptor de GPIIb (SEQ ID NO: 1) el cual contenía un codón codificante de valina, respectivamente en los sitios codificantes para las posiciones de aminoácido 233 y 239.

**Ejemplo 2: Expresión de la proteína de fusión GPIIb-(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6XHis) recombinante en células HEK**

35 Células HEK 293 (células de riñón embrionarias humanas; número ATCC: CRL-1573; Cell Lines Service CLS, Heidelberg) fueron transformadas con el constructo descrito en el ejemplo 1.

Las células se cultivan en:

DMEM (Art.-No.:31966-021, Invitrogen)

+ 10% de FBS Origin EU (Art.-No.:10270-106, Invitrogen), que se activó con calor, o en 10% de FBS Origin USA (Art.-No.:A15-003, Lot-No.:A01123-678, PAA)

40 + 1 % solución de antibiótico-antimicótico (100X) (Art.-No.:P11-002, PAA)

+ 0,1% solución de gentamicina 50mg/ml (Art.-No.:P11-005, PAA)

+ 500mg/ml solución de geneticina (G418) 50mg/ml de geneticina activa (Art.-No.:10131-027, Invitrogen)

Para la expresión (producción):

OPTIPRO-SFM (Art.-No.:12309-019, Invitrogen)

+ 0,5% solución de antibiótico – antimicótico (100X) (Art.-No.:P11-002, PAA)

+ 0,05% solución de gentamicina 50mg/ml (Art.-No.:P11-005, PAA)

5 + 2% glutamax I (100X) (Art.-No.: 35050-038, Invitrogen)

y sin geneticina

El proceso es como sigue a continuación:

1) descongelar las células (1 "Kryo" con  $5-10 \times 10^6$  células) y cultivo en T175 en medio que contiene suero durante 96 h

10 2) dividir en 4x T175 y cultivar durante 72-96h

3) dividir en 25x T175 y cultivar durante 72-96h

4) dividir T175 y seguir cultivando como reserva. Dividir el resto 24x T175 en 3x CellStack Corning (de a 10 niveles por CellStack en total con  $6360\text{cm}^2$ ) y cultivar durante 72h

15 5) retirar el medio, lavar 1-2x el monolayer (monocapa) con DMEM sin FBS y adicionar OPTIPRO-SFM (1,8 litros por CellStack) libre de suero y cultivar durante 96h

6) cosechar el medio, retirar por centrifugación el sobrenadante y resuspender el comprimido de las células desprendidas y devolverlas al CellStack con OPTIPRO-SFM fresco y cultivar por 96h

7) tal como en 6)

8) cosechar finalmente el medio y finalizar el cultivo

20 **Ejemplo 3: Aislamiento de la proteína de fusión GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6XHis)-recombinante mediante cromatografía de afinidad**

25 El medio que contiene GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6XHis) obtenida según el ejemplo 2, se libera de las células o de los fragmentos de célula aún presentes mediante centrifugación (35 min, 10.000 rpm, Beckman J2-21, Beckman Coulter GmbH, Alemania). El sobrenadante libre de células obtenido de esta manera, se concentra por medio de filtración tangencial utilizando un casete de ultrafiltración con una frontera de separación de 10 kDa (PES 10, Schleicher & Schüll, Alemania) a 1/10 del volumen de partida.

30 La purificación se efectúa mediante cromatografía de afinidad utilizando una sefarosa Ni<sup>2+</sup> (His Prep FF16/10, GE Healthcare, Suecia) según datos del fabricante. Para enlazar la GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6XHis) al sobrenadante concentrado se adicionan 500 mmol de NaCl, 20 mmol de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 5 mM de imidazol, y  
35 adicionando 5 M de HCl se ajusta el valor de pH a pH 7,4. Los componentes no enlazados se retiran lavándose mediante enjuague de la columna con una solución tampón de 500 mMol de NaCl, 20 mmol de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM de imidazol, pH 7,4. La elución de la GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6xHis) enlazada se efectúa con una solución tampón de 20 mMol de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mMol de NaCl, 500 mMol de imidazol, pH 7,4. El eluido obtenido de esta  
40 manera se concentra en una celda de agitación de ultrafiltración con una membrana de ultrafiltración, límite de separación 10 kDa (OMEGA 10 K, Pall Life Sciences, USA) a 1/10 del volumen de partida. La purificación y separación adicional de los contaminantes se efectúa mediante filtración en gel, utilizando una columna cromatográfica Superdex 200, grado de preparación 35/600 (GE Healthcare, Suecia) según indicaciones del fabricante. La cromatografía se efectúa con una tasa de fluido de 5,0 ml/min utilizando una solución tampón de 0,048 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02 mol/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,145 mol/L de NaCl, 0,015 mol/L de NaN<sub>3</sub>, pH 7,2. Después de cargar la muestra GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3XFlag)-(6xHis) se eluye en un pico según un volumen de elución de aproximadamente 300 ml de la columna de cromatografía empleada.

**Ejemplo 4: Método para determinar la actividad de VWF en un anti-FLAG/GPIba-ELISA sin ristocetina**

Se utilizaron placas de ELISA que ya estaban recubiertas con un anticuerpo contra la etiqueta Flag-tag (Sigma, Saint Louis, USA, ANTI-FLAG HS, M2 coated 96-well Plates (clear), Product Number P 2983). En cada cavidad de la



- placa ELISA se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución tampón de fosfato que contenía proteína de fusión de GPIb $\alpha$ -(33Flag)-(63His) típica silvestre (1:10 sobrenadante diluido del medio de cultivo después de sedimentación de células) o proteína de fusión GPIb $\alpha$ -(aa1-285,G233V/M239V)-(3XFlag)-(6XHis) aislada recombinante (véase ejemplo 3) en una concentración de 2,4  $\mu$ g/mL, y se incubó durante una noche a 2-8 °C. Después de lavar 4 veces con una solución tampón de fosfato (+ 0,01 % de Tween®), se adicionaron 50  $\mu$ L de una dilución de Hämäte® (ZLB Behring, Marburg, Alemania) en solución tampón de fosfato + 0,1 % de albúmina de suero bovino, así como 50  $\mu$ L de una dilución de ristocetina en solución tampón de fosfato + 0,1% de albúmina de suero bovino. Después se efectuó una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 4 veces tal como se indicó con anterioridad, se adicionaron 100  $\mu$ L de un anticuerpo de anti-VWF acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Rabbit Anti-Human VWF/HRP, DAKO, Ref. P0226), se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó como se hizo anteriormente. A continuación se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de tetrametilbenzidina como sustrato (sustrato de TMB, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania, Ref. 450684), se incubó durante 4 minutos a temperatura ambiente. Adicionando 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico de 0,5 N se detuvo la reacción. Después se efectuó la medición de la extinción a 405 nm en un espectrofotómetro.
- 15 En ausencia de ristocetina, al utilizar GPIb $\alpha$  mutante producida según los ejemplos 1-3 se efectuó un enlace, fuerte y dependiente, de concentración de VWF. Adicionando ristocetina se incrementó muy poco este enlace, lo cual puede atribuirse a un enlace no específico, que también tiene lugar sin GPIb $\alpha$ . Por lo contrario, un enlace de VWF similarmente fuerte en la GPIb $\alpha$  de tipo silvestre puede lograrse solo adicionando 1,2 mg/mL de ristocetina. Sin adición de ristocetina al utilizar GPIb $\alpha$  de tipo silvestre no tiene lugar un enlace en absoluto (Figura 1).

20 **Ejemplo 5: Método para determinar la actividad de VWF en un ensayo de aglutinación de partículas de látex GPIb $\alpha$  sin ristocetina**

Se prepararon tres reactivos:

Reactivo 1:

- 25 El anticuerpo anti-GPIb $\alpha$  antimonoclonal VM16d (Sanbio B.V., Uden, Holanda: número de producto MON 1146) se enlazó a la superficie de partículas de látex, y las partículas se resuspendieron en una solución tampón para almacenamiento por largo tiempo (0,6 g/L de TRIS, 1,1 % de leucina, 12,5 % de sacarosa, 0,05 % de HSA, 6,25 mg/L de gentamicina y 0,625 mg/L de anfotericina, pH 8.25, concentración de látex 0,22 %).

Reactivo 2:

Plasma con deficiencia de VWF

- 30 Reactivo 3:

Los siguientes componentes se mezclaron y dieron lugar a un volumen total de 30 mL de reactivo 3:

2,5 mL de una solución al 7,5 % de polivinilpirrolidona (PVP) (Fluka, Alemania) en tampón de fosfato (pH 7,1),

12,9 mL (0,625 mg/mL) de reactivo heterofílico de bloqueo 1 (Scantibodies Laboratory Inc, Santee, CA 92071, USA) en solución tampón Tris (pH 7,1),

- 35 3,4 mL de una solución con 21 g/L de Tween® 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) en tampón de fosfato (pH 7,2),

0,086 mL de una solución de 5,59 mg/mL de GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(33Flag)-(63His) recombinante (véase ejemplo 3) en tampón de fosfato (pH 7,1), y

11,2 mL de solución tampón de fosfato (pH 7,1).

- 40 El ensayo se efectuó en el instrumento de análisis de coagulación automático BCS® (Behring Coagulation System, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Se mezclaron 15  $\mu$ L de una muestra de plasma citrato humano, 30  $\mu$ L de reactivo 2 y 70  $\mu$ L de reactivo 3. El inicio de la reacción se efectuó adicionando y mezclando con 40 mL de reactivo 1. La extinción de la mezcla de reacción se midió continuamente a 575 nm. La velocidad de la aglutinación de las partículas de látex se efectuó dependiendo de la actividad del VWF en la muestra.

- 45 Para calcular la actividad de VWF se elaboró una curva de calibración utilizando Standard Human Plasma (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Como valor de referencia de VWF se utilizó el valor de co-factor de ristocetina declarado para el sistema BCS®. Elevando el volumen del Standard Human Plasma durante reducción simultánea de la cantidad correspondiente de reactivo 2, se generaron actividades de VWF de hasta 200 %.

Diluyendo el Standard Human Plasma con reactivo 2 se generaron actividades más bajas de VWF. Una curva de calibración típica está representada en la figura 2. La actividad de VWF de una muestra puede leerse en la curva de calibración con ayuda de la velocidad de reacción determinada.

- 5 En una mezcla de ensayo para medir actividades de VWF particularmente bajas en una muestra, en lugar de 15 o 30 mL de muestra (véase arriba) se emplearon 45 µL de muestra. En la calibración se diluyó Standard Human Plasma con reactivo 2, de tal modo que se generaron actividades bajas de VWF de hasta 3 % (véase figura 3). Esta mezcla de reacción hace posible la determinación exacta de actividades extremadamente bajas de VWF, lo cual es particularmente importante en la formación de la relación de actividad de VWF/antígeno con el fin de clasificar el
- 10 síndrome de von Willebrand. Incrementando la concentración de PVP a 0,35 % en la mezcla y el volumen de muestra a 60 µL puede reforzarse adicionalmente la aglutinación dependiente de VWF, y puede efectuarse además una diferenciación de 1 % VWF y 0 % VWF. De esta manera puede distinguirse con gran seguridad una enfermedad de von Willebrand tipo 3 (0 % VWF) de deficiencias extremadamente fuertes de otros tipos (por ejemplo 1-5 %).

**Ejemplo 6: Método de la invención para determinar la actividad de escisión de VWF de la proteasa ADAMTS-13 con VWF multimérico de alto peso molecular, pretratado con urea (P1648S) como sustrato VWF**

- 15 1. Tampón de reacción: 1 mmol/L de Pefabloc SC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 12,5 mmol/L de BaCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L de TRIS, pH 8,0;
2. Preparar tampón de sustrato e incubar exactamente 5 minutos a temperatura ambiente: 8,3 U/mL (830 %) de VWF-P1648S multimérico, de alto peso molecular, preparado de modo recombinante, 4,6 mol/L de urea, 4,6 mmol/L de TRIS, pH 8,0;
- 20 3. 15 µL de muestra de plasma humano se mezclan con 300 µL de tampón de reacción y a continuación se mezclan con 150 mL de tampón de sustrato;
4. Incubación de la mezcla de ensayo por 4 a 8 horas a 37 °C;
5. Medición de la actividad de VWF empleando esta mezcla de reacción como muestra, tal como se describe en el ejemplo 5.

25 **Ejemplo 7: Método de la invención para determinar der la actividad de escisión de VWF de la proteasa ADAMTS-13 con VWF (P1648S) multimérico, de alto peso molecular, recombinante, tratado previamente con urea, como sustrato de VWF**

1. 6 µL de muestra de plasma humano (1:6 diluido con tampón de reacción, véase ejemplo 6) se mezclan con 20 µL de tampón de reacción;
- 30 2. Incubación de la mezcla por 5 minutos a 37 °C para activar la proteasa ADAMTS-13;
3. Adición de 12 µL de tampón de sustrato (5 U/mL (500 %) de VWF-P1648S multimérico, de alto peso molecular, recombinante, 5 mol/L de urea, 5 mmol/L de Tris-HCl, pH 8,0);
4. Incubación de la mezcla de ensayo por 20 minutos a 37 °C;
- 35 5. Medición de la actividad de VWF empleando esta mezcla de reacción como muestra tal como se describe en el ejemplo 5.

**Ejemplo 8: Método de la invención para determinar la actividad de escisión de VWF de la proteasa ADAMTS-13 con VWF (P1648S) multimérico de alto peso molecular como sustrato de VWF y formación de diferencia con/sin degradación de ADAMTS-13**

Ensayo 1:

- 40 1. 10 µL de una muestra de plasma humano se mezclan con 20 mL de tampón de activación de ADAMTS-13 (18,75 mmol/L de BaCl<sub>2</sub>, pH 8,0, 5 mmol/L de Tris-HCl, 1,5 mmol/L de Pefabloc SC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania));
2. Incubación de la mezcla por 5 minutos a 37 °C;
- 45 3. Adición de 20 mL con 1,25 U/mL (125 %) de sustrato de VWF recombinante (P1648S) en 5 mmol/L de Tris-HCl, pH 8,0;

4. Incubación de la mezcla de ensayo por 20 minutos a 37 °C;

5. Medición de la actividad de VWF empleando esta mezcla de reacción como muestra, tal como se describe en el ejemplo 5.

Ensayo 2:

- 5 Otros 10 mL de la misma muestra de plasma humano se tratan tal como en el ensayo 1, aunque con la diferencia de que no se realiza el paso de incubación durante 20 minutos a 37 °C (véase paso No. 4), sino que la medición de la actividad de VWF se efectúa empleando esta mezcla de reacción como muestra, tal como se describe en el ejemplo 5 inmediatamente después de la adición del sustrato de VWF (P1648S). La diferencia de la actividad de VWF del ensayo 1 y ensayo 2 da lugar a la cantidad degradada de actividad de VWF, y con esto a la actividad de ADAMTS-13. Mediante una calibración se determina de esta la actividad de ADAMTS-13 en la muestra de plasma.
- 10

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

<120> Método para determinar la actividad de factor de von Willebrand en ausencia de ristocetina y para determinar la proteasa ADAMTS-13

15 <130> 2007P59005WE01 - Ma 1289

<140> EP 11002342.1

<141> 2008-07-03

<150> DE 10 2007 031 708.7

<151> 2007-07-06

20 <160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 610

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 1

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn  
 1 5 10 15  
 Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp  
 20 25 30  
 Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu  
 35 40 45  
 Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg  
 50 55 60  
 Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu  
 100 105 110  
 Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu  
 115 120 125  
 Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu  
 130 135 140  
 Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu

<110> Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

<120> Método para determinar la actividad de factor de von Willebrand en ausencia de ristocetina y para determinar la proteasa ADAMTS-13

5 <130> 2007P59005WE01 - Ma 1289

<140> EP 11002342.1

<141> 2008-07-03

<150> DE 10 2007 031 708.7

<151> 2007-07-06

10 <160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 610

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1          5          10          15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
          20          25          30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
          35          40          45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50          55          60

Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65          70          75          80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
          85          90          95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
          100          105          110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
          115          120          125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
          130          135          140

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145          150          155          160

```

**REIVINDICACIONES**

1. Método para determinar la actividad de escisión del factor de von Willebrand (VWF) de la proteasa ADAMTS-13 en una muestra, el cual comprende los siguientes pasos:

- 5 a) mezclar la muestra que contiene presumiblemente la proteasa ADAMTS-13 con VWF aislado como sustrato para producir una mezcla de reacción,
- b) Incubación de la mezcla de reacción, y
- c) Determinación de la actividad restante de VWF en la mezcla de reacción, en cuyo caso

10 el sustrato de VWF se compone de VWF multimérico, de alto peso molecular, el cual contiene monómeros de VWF que tienen al menos una variación de secuencia de aminoácido, que lleva a que el sustrato de VWF – comparado con un sustrato de VWF que se compone de VWF multimérico de alto peso molecular de monómeros de VWF de tipo silvestre conduzca a una degradación acelerada por parte de ADAMTS-13,

**caracterizado porque**

15 en el paso c) la determinación de la actividad restante de VWF en la mezcla de reacción se efectúa con un método en el cual la muestra se mezcla con proteína GPIIb $\alpha$  aislada que comprende una secuencia de aminoácido, que contiene, en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO:1), al menos los residuos de aminoácidos 1-268, y tiene respectivamente una sustitución de aminoácido Xaa en las posiciones 233 y 239, para producir una mezcla de ensayo, y en el cual a la mezcla de reacción no se agrega ristocetina y ni botrocetina.

20 2. Método según la reivindicación 1, donde los monómeros de VWF del sustrato de VWF de VFW multimérico, de alto peso molecular tienen al menos una variación de secuencia de aminoácido de los siguientes grupos:

P1648S, E1638K, G1505R, S1506L, M1528V, R1569del, R1597W, V1607D, G1609R, G1629E, G1631D, R1597Q, V1499E y Y1584C.

3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, donde el sustrato de VWF multimérico de alto peso molecular se produce de modo recombinante.

25 4. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, donde el sustrato de VWF multimérico, de alto peso molecular se aísla de plasmas de donantes de soportes heterocigóticos u homocigóticos de una adecuada variación de secuencia de aminoácidos de VWF.

5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde en el paso a) la muestra se mezcla adicionalmente con heparina.

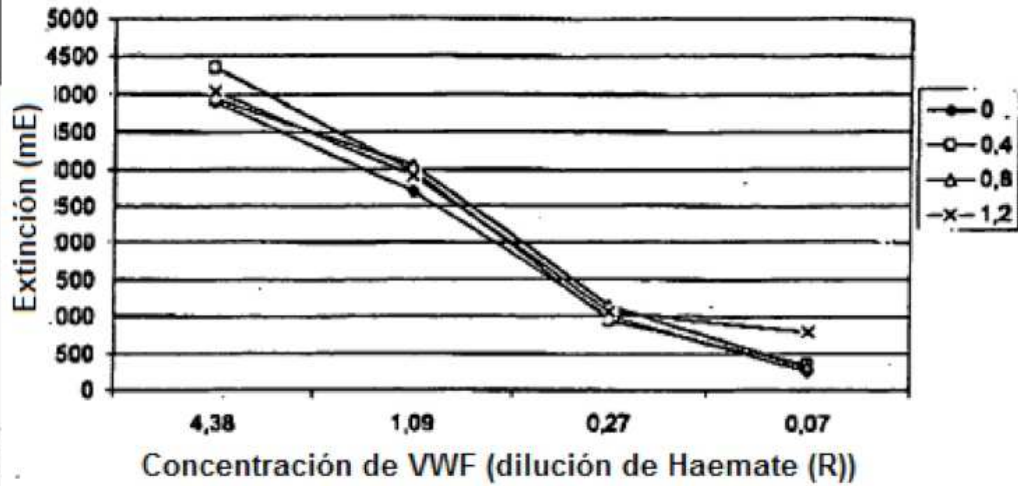
30 6. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la sustitución de aminoácido Xaa en posición 233 y/o posición 239 de la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada se compone de un residuo de valina o de un residuo de serina.

7. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está asociada con una fase sólida, de manera preferente con una fase sólida en forma de partículas.

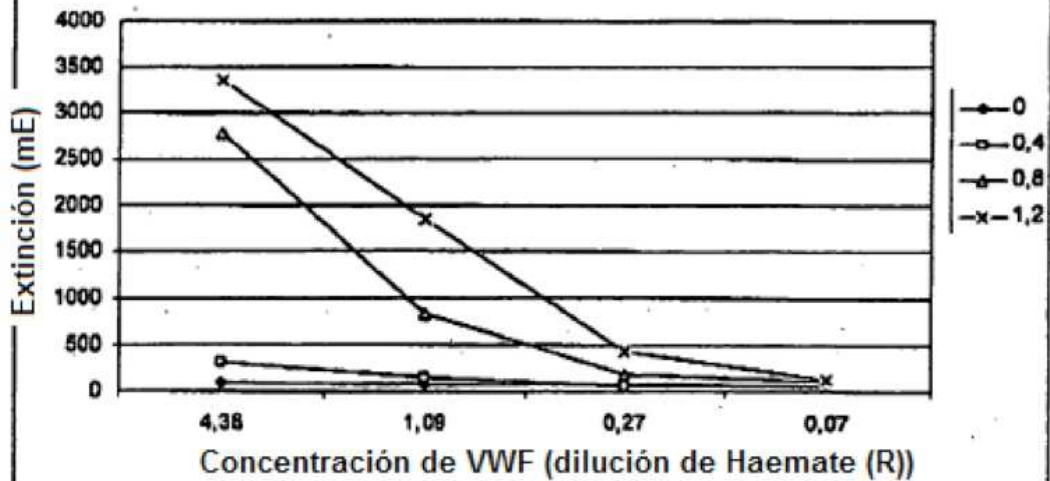
35 8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado porque** la actividad de VWF se determina mediante la aglutinación mediada por GPIIb $\alpha$  de la fase sólida en forma de partículas.

**Figura 1**

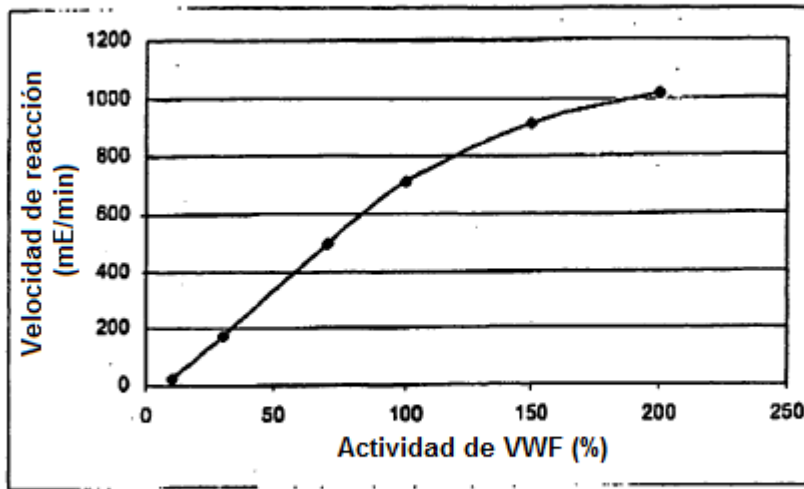
Enlace de VWF en ELISA a base de GPIIb-(aa1-285, G233V/M239V) dependiendo de la concentración de ristocetina (mg/mL)



Enlace de VWF en ELISA a base de GPIIb de tipo silvestre dependiendo de la concentración de ristocetina (mg/mL)



**Figura 2**



**Figura 3**

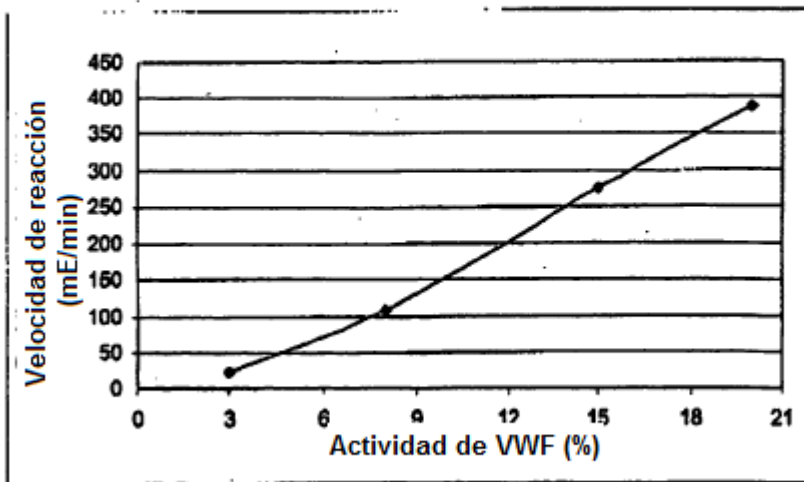




Figura 4

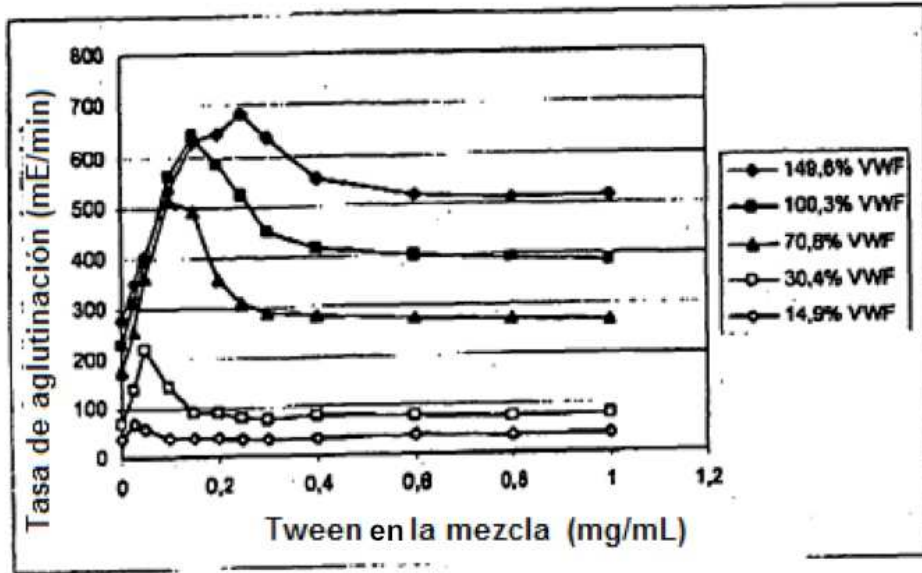


Figura 5

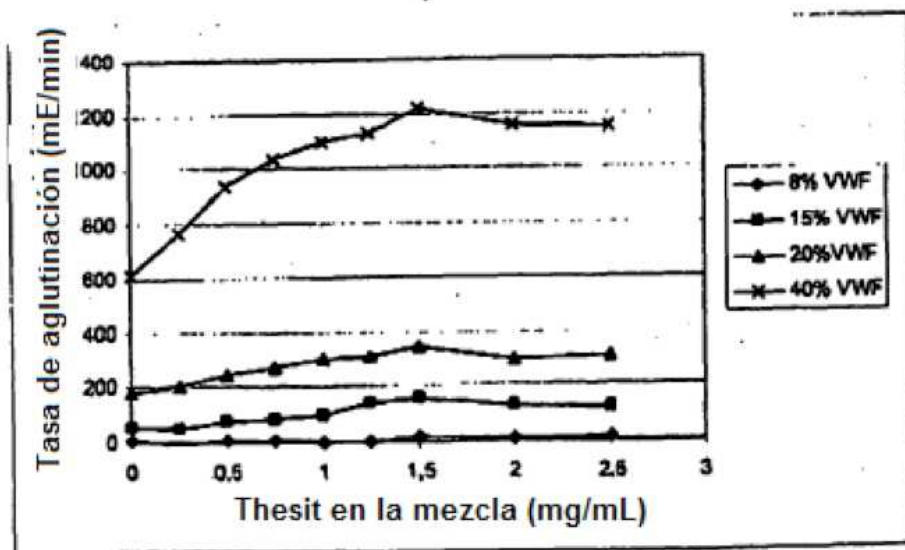


Figura 6

