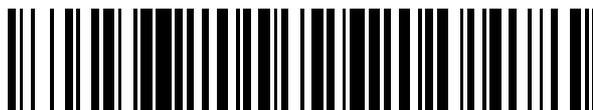


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 162**

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 08773827 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2167978**

54 Título: **Método para determinar la actividad del factor de von Willebrand en ausencia de ristocetina**

30 Prioridad:

**06.07.2007 DE 102007031708**

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

**16.12.2015**

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, JUERGEN y  
SCHNEPPENHEIM, REINHARD**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 554 162 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

Método para determinar la actividad del factor de von Willebrand en ausencia de ristocetina

La invención se encuentra en el campo de la diagnosis de coagulación y se refiere a un método in vitro para determinar la actividad del factor de von Willebrand (VWF) en una muestra. El método comprende el uso de una variante de ganancia de función mutante de la proteína GPIb $\alpha$ , por lo cual puede prescindirse del uso de ristocetina, botrocetina o de otra sustancia equivalente a ristocetina o botrocetina.

El factor de von Willebrand (VWF) es una glicoproteína multímera de alto peso molecular en el plasma sanguíneo, el cual tiene funciones importantes en el proceso de la hemostasis primaria. El VWF dispone, entre otros, de sitios de enlazamiento para colágeno y para la glicoproteína Ib (GPIb), que se localiza en la superficie de los trombocitos. GPIB es una proteína de membrana integral la cual forma con otra proteína de membrana integral, la glicoproteína IX (GPIX), al complejo receptor Ib-IX de glicoproteína en la membrana de trombocitos. GPIB es una molécula de cadena doble que está compuesta de una cadena pesada con una masa molecular aparente de aproximadamente 145 kDa (sinónimo: heavy chain, cadena alfa o GPIb $\alpha$ ) y una cadena ligera con una masa molecular aparente de aproximadamente 22 kDa (sinónimo: light chain, cadena beta o GPIb $\beta$ ), las cuales se enlazan entre sí por medio de puentes de disulfuro [Lopez, J.A. et al. (1987) Cloning of the  $\alpha$  chain of human platelet glycoprotein Ib: A transmembrane protein with homology to leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 5615-5619].

En el caso de una lesión de vasos se exponen las superficies de colágeno a las que se enlaza el VWF. Como consecuencia del enlazamiento en colágeno bajo la influencia de las fuerzas de corte incrementadas, las cuales actúan sobre el VWF enlazado a colágeno, el VWF se modifica o se activa de tal manera que puede enlazarse al extremo aminoterminal de la cadena pesada de la GPIB (GPIb $\alpha$ ) en el complejo GPIB-IX-receptor de la membrana de trombocitos. De esta manera, el VWF activado atrapa trombocitos que pasan fluyendo, de modo que en el sitio de la lesión se forma un primer aglomerado de VWF, colágeno y trombocitos. Como consecuencia se activan los trombocitos y con esto también se pone en marcha la coagulación plasmática que en últimas conduce al cierre de la herida, después de varias cascadas de refuerzo y del depósito de otros trombocitos.

Los trastornos cualitativos o cuantitativos del VWF son la causa del llamado síndrome de von Willebrand (sinónimo: enfermedad de von Willebrand, VWD), una de las enfermedades hemorrágicas hereditarias más frecuentes. Para el diagnóstico del síndrome de von Willebrand se encuentran disponibles diferentes métodos de detección, tales como, por ejemplo, la determinación del tiempo de hemorragia (BT), métodos cuantitativos para determinar la concentración de antígeno – VWF (VWF:Ag), tales como, por ejemplo, método ELISA, así como métodos para la determinación de la actividad de VWF, tales como, por ejemplo, la aglutinación de plaquetas inducida por ristocetina (VWF:RCo).

El método de la agregación de trombocitos estabilizados, inducida por ristocetina, el cual también se denomina ensayo de ristocetina-cofactor, también reconoce aquellos defectos funcionales de la proteína de VWF, los cuales no pueden reconocerse con métodos cuantitativos para determinar la concentración de antígeno-VWF. Por eso, la realización de un ensayo de cofactor-ristocetina para determinar la actividad de cofactor-ristocetina es necesaria para el diagnóstico completo de un síndrome de von Willebrand. Habitualmente se realiza el ensayo de cofactor-ristocetina mezclando una muestra de plasma de un paciente con trombocitos fijos y con ristocetina. La ristocetina induce el enlazamiento del VWF contenido en la muestra al receptor de GPIb de los trombocitos adicionados, por lo cual se acumulan los trombocitos. La dimensión de esta reacción de acumulación se correlaciona con la cantidad de VWF activo, que está contenido en la muestra del paciente. La reacción de acumulación puede registrarse ópticamente, por ejemplo midiendo el aumento de transmisión y permite de esta manera una cuantificación de la actividad de VWF:RCo.

En comparación con un ensayo de antígeno, el ensayo de cofactor-ristocetina ofrece la ventaja de la determinación de actividad del VWF y permite con esto el reconocimiento de trastornos funcionales del VWF y de la clasificación de diversos subtipos del síndrome de von Willebrand, los cuales también van acompañados solamente de manera parcial con una concentración reducida de antígeno. Con frecuencia, para la clasificación de subtipos se forma la proporción (relación) de la actividad de VWF-ristocetina-cofactor (VWF:RCo) y la concentración de antígeno (VWF:Ag). Para los subtipos 2A, 2B y 2M del síndrome de von Willebrand es característica una proporción de VWF:RCo/VWF:Ag menor a 1. Como valor límite con frecuencia se recomienda una proporción de 0,7.

Una desventaja del ensayo clásico de cofactor-ristocetina es la difícil capacidad de automatización del método, ya que los trombocitos en la mezcla para el ensayo tienen que revolverse para mezclarse bien de manera permanente durante la medición. Además, es desventajoso que el ensayo sea relativamente impreciso y la determinación de actividades de VWF muy bajas, en el intervalo entre 0 y 20% de la norma, funciona solamente de manera insuficiente.

En un tiempo anterior, se desarrollaron ensayos de VWF-ELISA basados en GPIb $\alpha$ , en los cuales se usan fragmentos de GPIb $\alpha$  recombinante (1-289 o 1-290) los cuales tienen la región de enlazamiento aminoterminal de VWF [WO 01/02853 A2 o Vanhoorelbeke, K. et al. (2002) A reliable von Willebrand factor: Ristocetina cofactor

- enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between type 1 and type 2 von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 28(2): 161-165 y Federici, A.B. et al. (2004) A sensitive ristocetina co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Iba for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Heamatologica* 89(1): 77-85]. En estos métodos de ensayo se enlaza un fragmento de GPIba recombinante con ayuda de un anticuerpo específico en una placa ELISA. Se adicionan la muestra del paciente y ristocetina de modo que el VWF de la muestra del paciente pueda enlazarse al fragmento de GPIba recombinante. Finalmente, el VWF enlazado se detecta cuantitativamente con ayuda de un anticuerpo anti-VWF. Se ha mostrado que este tipo de ensayos VWF-ELISA se correlaciona muy bien con los resultados del ensayo de actividad de cofactor-ristocetina-VWF clásico, basado en trombocitos e incluso son más sensibles y precisos.
- 5
- 10 Hui et al. (Abstract, ISTH 2007) describen un ensayo VWF-ELISA basado en GPIba, en el cual se usan fragmentos de GPIba recombinante (1-483) con mutaciones en las posiciones 233 y 239. Estas mutaciones son las llamadas mutaciones de ganancia de función (gain-of-function), las cuales, como es sabido, presentan una afinidad superior por VWF en presencia de concentraciones bajas de ristocetina e interactúan más vigorosamente con VWF que la proteína GPIba de tipo silvestre (WO 93/16712). Las mutaciones mencionadas son variantes mutantes conocidas desde hace tiempo de la cadena de GPIba. La sustitución del residuo glicina en posición 233 de la cadena de GPIba por un residuo valina (G233V) fue descrita por Miller et al. (US 5,317,097). Esta mutación es la causa del síndrome de von Willebrand de tipo plaqueta (PT-VWD), una enfermedad hemorrágica autosómica dominante hereditaria. La sustitución del residuo metionina en posición 239 de la cadena de GPIba por un residuo valina (M239V) fue descrita por Russell & Roth [Russell, S.D. & Roth, G.J. (1993) Pseudo-von Willebrand Disease: A mutation in the platelet glycoprotein Iba gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood* 81(7), 1787-1791]. Esta mutación también causa la PT-VWD.
- 15
- 20 Una ventaja de los ensayos descritos de VWF-ELISA basados en GPIba y también del ensayo de cofactor-ristocetina es que se basan en el uso de ristocetina o de otros moduladores exógenos, no fisiológicos, los cuales intervienen en el enlazamiento de VWF a la cadena de GPIba. La ristocetina, un glicopéptido antibiótico de la bacteria *Nocardia lurida*, así como botrocetina (sinónimo: Co-Aglutinina), un veneno de serpiente del género *Bothrops*, se usan de manera conocida a fin de inducir in vitro el enlazamiento de VWF a trombocitos o a proteína de GPIba aislada o fragmentos de la misma. La utilización de ristocetina tiene la desventaja que no solamente puede enlazarse a VWF, sino también a muchas otras proteínas como, por ejemplo, a fibrinogeno o también a anticuerpos anti-GPIba (observado en experimentos propios). De esta manera, al usar ristocetina en métodos de ensayo de VWF, existe el riesgo de que surjan reacciones de enlazamiento no específicas o reacciones de precipitación, las cuales pueden falsear el resultado de ensayo.
- 25
- 30 El problema que sirve de fundamento a la invención consistió entonces en proporcionar un método para determinar la actividad de VWF, el cual pueda realizarse en ausencia de ristocetina.
- 35 El problema se resuelve usando una variante de ganancia de función (gain-of-function) de la cadena de GPIba con dos mutaciones puntuales, en posición 233 y en posición 239, respecto de la secuencia de aminoácidos del receptor de GPIba humana. Por variante de ganancia de función (gain-of-function) de la cadena de GPIba en el contexto de la presente invención debe entenderse una variante mutante que presenta de manera conocida una afinidad superior por VWF en presencia de concentraciones mínimas de ristocetina e interactúa más vigorosamente con VWF que la proteína GPIba de tipo silvestre.
- 40 Biswas et al. (*BLOOD*, volumen 106, No. 11, parte 2, página 67B) describen un sistema de ensayo ELISA en el cual una proteína GPIba aislada se asocia con una fase sólida no particulada y mencionan, entre otros, los resultados de estudios experimentales sobre la interacción de vWF con proteína GPIba aislada, la cual está mutada en las posiciones 233 y 239.
- 45 Es objeto de la invención un método para determinar la actividad del factor de von Willebrand (VWF) en una muestra, en cuyo caso la muestra se mezcla con proteína GPIba aislada para generar una preparación de ensayo, y a la preparación de ensayo no se agrega ristocetina ni botrocetina. La proteína GPIba utilizada comprende una secuencia de aminoácidos que en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína GPIba humana contiene al menos los residuos de aminoácidos 1-268 y la cual presenta en las posiciones 233 y 239, respectivamente, una sustitución Xaa (SEQ ID NO: 1). La proteína GP1ba utilizada se asocia con una fase sólida en forma de partículas. De manera preferente, las sustituciones Xaa del residuo glicina en la posición 233 y del residuo metionina en la posición 239 de la cadena de GPIba consisten en un residuo valina (G233V o M239V) o un residuo serina (G233S o M239S). Es posible cada combinación cualquiera de las diversas sustituciones Xaa en ambas posiciones. Al describir la invención, debe entenderse cada referencia a la proteína GPIba como una referencia a una variante mutante de este tipo.
- 50
- 55 De manera preferente, a la preparación del ensayo no se adicionan además ninguna "sustancia equivalente a ristocetina o a botrocetina". Por el término "sustancia equivalente a ristocetina o a botrocetina" en el contexto de la presente invención se entiende una sustancia exógena, es decir no fisiológica, que tiene la capacidad de inducir in vitro un enlazamiento de VWF a la cadena de GPIba de tipo silvestre o a fragmentos de la misma.

Una ventaja de la presente invención es que utilizando una variante de ganancia de función de GPIIbα también pueden prescindirse de ejercer stress de corte sobre la preparación de ensayo tal como, por ejemplo, mediante generación de corriente, revolviendo o agitando.

5 Por una "muestra", en referencia al método para determinar la actividad de VWF, se entiende el material que contiene la sustancia que va a detectarse, es decir que contiene supuestamente al VWF. El término "muestra" comprende, por ejemplo, líquidos biológicos, principalmente de seres humanos y de animales, tales como sangre, plasma o suero, así como productos elaborados industrialmente como, por ejemplo, calibradores o controles de VWF o concentrados VWF de alta concentración, los cuales están previstos para, por ejemplo, la terapia de sustitución de  
10 pacientes con síndrome de von Willebrand (por ejemplo Haemate®P). Eventualmente, las muestras tienen que tratarse previamente a fin de hacer accesible el analito para el método de detección o a fin de retirar los ingredientes de la muestra que estorben. Tal tratamiento previo de las muestras puede incluir la separación y/o la lisis de células o la centrifugación de las muestras. El término "muestra" comprende también mezclas de reacción compuestas de uno de los materiales de muestra previamente mencionados, al cual se le ha adicionado VWF aislado en calidad de sustrato a fin de determinar la actividad de un factor modificador de VWF, y en los cuales debe determinarse la  
15 actividad residual de VWF después de la incubación del sustrato de VWF con el factor modificador de VWF. Ejemplos de tales mezclas de reacción son, por ejemplo, mezclas de una muestra de plasma con VWF aislado de alto peso molecular para determinar proteasa de ADAMTS-13 que disocia VWF en la muestra de plasma. La proteasa ADAMTS-13 contenida en la muestra de plasma disocia el sustrato de VWF adicionado y reduce de esta manera la actividad de VWF de la muestra.

20 La cadena de GPIIbα utilizada en el método de la invención puede ser una proteína de GPIIbα producida de manera recombinante o sintética. Para la preparación de la proteína de GPIIbα recombinante son adecuados sistemas conocidos de expresión, procariotas o eucariotas, como por ejemplo la expresión en bacterias (por ejemplo E. coli), en levadura (por ejemplo Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris), en cultivos celulares vegetales, animales o humanos. Para la preparación de la proteína GPIIbα sintética son adecuadas técnicas conocidas para la síntesis in  
25 vitro de proteína, tales como, por ejemplo, síntesis en fase sólida (por ejemplo síntesis de Merrifield). De manera preferente la proteína GPIIbα utilizada en el método de la invención es una proteína GPIIbα producida de modo recombinante que ha sido producida en un cultivo de células humanas, preferible en un cultivo de células de riñón humano embrionario (células HEK).

30 La proteína GPIIbα utilizada en el método de la invención pueden estar fusionada en el terminal N con la secuencia de señal de GPIIbα humana homóloga MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO: 2, también denominada residuos de aminoácidos -16 a -1). De manera alternativa, la proteína GPIIbα utilizada puede estar fusionada en el terminal N con una secuencia de señal heteróloga, es decir con un polipéptido que habitualmente no está presente en el polipéptido de GPIIbα humano, pero que en el sistema de expresión seleccionado influye positivamente a la expresión y/o secreción de la proteína GPIIbα expresada de manera recombinante. Una secuencia de señal heteróloga adecuada es, por ejemplo, MPLQLLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRR (SEQ ID NO: 3).  
35

Además, la proteína GPIIbα utilizada en el método de la invención puede estar fusionada en el terminal C con una o varias etiquetas de afinidad, las cuales permiten el enlazamiento, por ejemplo, de la proteína expresada de modo recombinante a un soporte de afinidad, por lo cual se hace posible, por ejemplo, la purificación de proteína GPIIbα expresada de modo recombinante, o incluso el enlazamiento de la proteína GPIIbα recombinante a una fase sólida.  
40 Se prefieren pequeñas etiquetas de afinidad con una longitud no mayor a 12 aminoácidos. Particularmente se prefieren etiquetas de afinidad del grupo His-Tag, Flag-Tag, Arg-Tag, c-Myc-Tag y Strep-Tag. Los soportes de afinidad adecuados, que se enlazan con afinidad superior a una etiqueta de afinidad, son por ejemplo anticuerpos específicos, cationes inmovilizados (por ejemplo Ni<sup>2+</sup> con afinidad por His-Tags) u otros tipos de contrapartes de enlazamiento (por ejemplo estreptavidina con afinidad por Strep-Tags).

45 En el método de la invención la proteína GPIIbα está asociada con una fase sólida en forma de partículas. El término "asociada" debe entenderse de manera amplia y comprende, por ejemplo, un enlace covalente y uno no covalente, un enlace directo y uno indirecto, la adsorción a una superficie y la inclusión en una cavidad. En el caso de un enlace covalente, la proteína GPIIbα aislada se enlaza mediante un enlace químico a la fase sólida. Un ejemplo de un enlace no covalente es la adsorción a una superficie. Además de un enlazamiento directo a la fase sólida, la  
50 proteína GPIIbα aislada también puede estar enlazada de manera indirecta a la fase sólida por medio de interacción específica con otras contrapartes específicas del enlace, por ejemplo mediante interacción específica con un anticuerpo, preferiblemente con un anticuerpo anti-GPIIbα o, siempre que la proteína GPIIbα aislada disponga de una etiqueta de afinidad, con un anticuerpo anti-etiqueta de afinidad.

55 El término "fase sólida en forma de partículas" en el contexto de este invención incluye un objeto que está compuesto de material poroso y/o no poroso, hidrofóbico y puede tener las formas más diversas de partículas como, por ejemplo, recipiente, tubo, placa de microtitulación (placa de ELISA), esfera, micropartícula, etc. Por lo regular la superficie de la fase sólida es hidrofílica o puede hacerse hidrofílica. La fase sólida puede estar compuesta de los más diversos materiales tales como, por ejemplo, de materiales inorgánicos y/u orgánicos, de materiales sintéticos, de origen natural y/o modificados de origen natural. Ejemplos de materiales de fase sólida son polímeros  
60 tales como, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli (cloruro de vinilo), poliacrilamida, moléculas

reticuladas de dextrano, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nylon; 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 revestimiento de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, carbohidratos, sustancias lipofílicas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de los mismos a fin de suprimir o de impedir, por ejemplo, el enlazamiento no específico de ingredientes de las muestras a la fase sólida, o para lograr, por ejemplo, mejoramientos respecto de la estabilidad de la suspensión de las fases sólidas en forma de partículas, la estabilidad durante el almacenamiento, la estabilidad de conformación o la resistencia frente a la luz-UV, microbios u otros agentes con efecto destructor.

10 Una forma de realización preferida del método de la invención para determinar la actividad de VWF comprende el uso de una proteína GPIIb asociada con partículas, preferiblemente una proteína GPIIb asociada con partículas de látex, y la determinación de la actividad de VWF por medio de aglutinación de la fase sólida en forma de partículas facilitada por GPIIb. De manera preferente, se utiliza una proteína GPIIb asociada a la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo. Para este propósito son adecuados los anticuerpos anti-GPIIb, principalmente los anticuerpos monoclonales VM16d [Mazurov, A.V. et al. (1991) Characterization of an antiglycoprotein Ib monoclonals antibody that specifically inhibits plateletthrombin interaction. Thromb Res. 62(6), 15 673-684; disponibles comercialmente, por ejemplo, en Sanbio B.V., Uden, Países Bajos: 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 ristocetina and collagen. Blood 69(2), 570-577; disponible comercialmente, por ejemplo, en Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA: número de producto IM0409]. Siempre que la proteína GPIIb utilizada esté fusionada en el terminal C con una o varias etiquetas Flag-Tags, igualmente es adecuado un anticuerpo anti-Flag [véase, por ejemplo, US 5,011,912; disponible comercialmente, por ejemplo, en Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania]. Para determinar de modo cuantitativo 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 la intensidad de dispersión de luz (nefelometría) o mediante la medición de la turbiedad del medio (turbidimetría).

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

En el caso de diferentes concentraciones de VWF y de concentraciones crecientes de Tween® 20 se determinó la tasa de aglutinación (véase la figura 4, determinación análoga en el ejemplo 5). Se hace claro que a concentraciones relativamente bajas de Tween® 20 (0,02-0,1 g/L) hay un refuerzo sobresaliente de la reacción, la cual se disminuye nuevamente con una concentración incrementada de Tween® 20 y se logra un nivel estable de refuerzo. De esta manera, a un VWF de 149,6 -% con aproximadamente 1 g/L de Tween® 20, se logra el nivel estable de refuerzo y el refuerzo alcanza entonces 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) a fin de aumentar determinadas concentraciones de VWF hasta 20 % de manera particularmente fuerte. De esta manera se obtiene, por ejemplo, a 0,05 g/L de Tween® 20 (en la preparación de ensayo) un aumento en la tasa de aglutinación en 216 % a 30,4 % de VWF. Puesto que las concentraciones más bajas de VWF son particularmente difíciles de determinar, en este caso un refuerzo de la reacción es muy útil. Por otra parte, un sistema de medición es generalmente más estable si se opera en el rango de saturación del detergente para todas las concentraciones relevantes de VWF. Este sería el caso, por ejemplo, desde 1 g/L Tween® 20. Esta variante es más adecuada para un ensayo de cribado para un espectro amplio de concentraciones de VWF. Las concentraciones de Tween® 20 de 0,6-20,0 g/L, preferiblemente de 1 g/L, son ventajosas si la reacción de aglutinación debe reforzarse en más de 20 % al determinar concentraciones de VWF.

Otros detergentes, tal 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 permanente dependiente de la concentración del refuerzo de la reacción de aglutinación (véase figura 5, determinación análoga al ejemplo 5: aunque 45 mL de muestra con Thesit en lugar de Tween® 20).

A fin de determinar la actividad de VWF de una muestra de plasma, habitualmente la muestra se diluye previamente con un regulador de pH o con plasma deficiente de VWF. De igual manera se procede con plasma normal (por ejemplo, plasma humana estándar) si debe elaborarse una curva de calibración. Se estableció que al diluir con plasma deficiente de VWF y a una concentración usual de detergente (1 g/L en la preparación de ensayo) se llega a un refuerzo indeseado de la aglutinación de las partículas de látex de GPIIb, el cual no obstante puede suprimirse mediante bastante detergente. Si se diluye la muestra (en este caso plasma humano estándar) con plasma deficiente de VWF o con regulador de pH, tal como se muestra en la figura 6, en una preparación de ensayo con 45 µL de muestra, entonces en presencia de plasma deficiente de VWF surgen tasas superiores de aglutinación a una determinada concentración de VWF. Si en el sistema de ensayo se prescinde por completo de detergente y la

muestra de plasma humano estándar se diluye con plasma deficiente de VWF, entonces por lo contrario resulta una tasa más baja de aglutinación al diluir con un regulador de pH. No obstante, si se adiciona bastante detergente (por ejemplo  $\geq 3$  g/L de Thesit), entonces se igualan las tasas de aglutinación al diluir con regulador de pH o con plasma deficiente. De esta manera, se garantiza la estabilidad ante la dilución de una muestra de plasma en un regulador de pH. Para un ensayo es extremadamente ventajoso si tanto la difusión de un plasma normal (como calibrador) como también una dilución eventual de la muestra del paciente pueden realizarse por medio de un regulador de pH sencillo y no tienen que realizarse por medio de un plasma deficiente de VWF. Un regulador de pH es económico para garantizar mejor la estabilidad durante el almacenamiento y muchos aparatos automáticos de ensayo utilizan un único regulador de pH para muchos ensayos. Además, un plasma deficiente de VWF muchas veces no se encuentra disponible en cada laboratorio. En las mediciones de concentrados de VWF, se realizan diluciones particularmente fuertes en cuyo caso es muy ventajosa una buena estabilidad ante la dilución en regulador de pH.

Además, se prefiere la determinación de la actividad de VWF por medio de la aglutinación facilitada por GPIIb $\alpha$  de una fase sólida en forma de partículas en presencia de polivinilpirrolidona (PVP), de manera preferente a una concentración de polivinilpirrolidona de 0,1 % a 1,0 % en la preparación de ensayo y/o en presencia de dextrano T500, preferentemente a una concentración de dextrano T500 de 0,1 % a 3 % en la preparación de ensayo y/o en presencia de alginatos 500-600 cP, de manera preferente a una concentración de alginatos 500-600 cP de 0,01 % a 0,2 % en la preparación de ensayo.

Otra modalidad preferida del método de la invención para determinar la actividad de VWF es un formato de ensayo competitivo. El método comprende la utilización de anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  asociado con partículas, preferiblemente VM16d, y de VWF asociado con partículas en una preparación de reacción y la adición de proteína GPIIb $\alpha$ . En presencia de la proteína GPIIb $\alpha$  y en ausencia de ristocetina, botrocetina o de una sustancia equivalente las partículas se aglutinan. 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.

La presente invención se refiere además a un kit de ensayo para uso en el método de la invención, en cuyo caso el kit de ensayo contiene al menos un reactivo que contiene la proteína GPIIb $\alpha$ , la cual comprende una secuencia de aminoácidos que en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO:1) contiene al menos los residuos de aminoácidos 1-268 y presenta en las posiciones 233 y 239 respectivamente una sustitución de aminoácidos Xaa y la cual está asociada con una fase sólida en forma de partículas. De manera preferente, el kit de ensayo contiene un reactivo que contiene proteína GPIIb $\alpha$  asociada con partículas de látex. De manera preferente, la proteína GPIIb $\alpha$  está asociada a la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo. El reactivo puede prepararse en forma líquida o liofilizada. Para el caso en que el reactivo esté presente como un liofilizado, el kit de ensayo puede contener adicionalmente un solvente requerido para suspender el liofilizado, tal como por ejemplo agua destilada o un regulador de pH adecuado.

Descripción de las figuras

#### Figura 1

La estructura del sistema de ensayo aplicado aquí de GPIIb $\alpha$ -(aa1-285,G233V/M239V) o GPIIb $\alpha$ -ELISA de tipo silvestre para determinar VWF está indicada en el ejemplo 4. Se emplearon 4 diferentes diluciones de concentrado de VWF/factor VIII Haemate® como muestra. En ausencia de ristocetina (0 mg/mL), usando GPIIb $\alpha$ -(aa1-285,G233V/M239V) mutante, se efectúa un enlazamiento de VWF, vigoroso y dependiente de la concentración (parte superior de la ilustración). Adicionando ristocetina este enlazamiento es susceptible de incrementarse de manera mínima, lo cual es atribuible probablemente a un enlazamiento no específico que también tiene lugar sin GPIIb $\alpha$ . Por lo contrario, un enlazamiento de VWF similarmente vigoroso en el caso de GPIIb $\alpha$  de tipo silvestre puede lograrse solamente adicionando 1,2 mg/mL de ristocetina. Al usar GPIIb $\alpha$  de tipo silvestre sin adición de ristocetina no tienen lugar un enlazamiento en lo absoluto (parte inferior de la ilustración).

#### Figura 2

Curva de calibración para determinar la actividad de VWF (10 % - 200 % de actividad de VWF) en muestras de plasma citrato humano mediante un ensayo de aglutinación de GPIIb $\alpha$ -partículas de látex sin ristocetina (véase el ejemplo 5). Representación de la velocidad de reacción de aglutinación de las partículas dependiendo de la actividad de VWF.

#### Figura 3

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

Figura 4

Ensayo de aglutinación de GPIIb $\alpha$ -partículas de látex sin ristocetina en muestras con diversas concentraciones de VWF (14,9 % a 149,6 %) y en presencia de diversas concentraciones de Tween® 20 en la preparación de ensayo (véase ejemplo 5, variación de la concentración de Tween® 20, 1-5 mL de muestra).

5 Figura 5

Ensayo de aglutinación de GPIIb $\alpha$ -partículas de látex sin ristocetina en muestras con diferente concentración de VWF (8 % a 40 %) y en presencia de diversas concentraciones de Thesit en la preparación de ensayo (véase el ejemplo 5, aunque Thesit en lugar de Tween® 20, 45 mL de muestra).

Figura 6

10 Ensayo de aglutinación de GPIIb $\alpha$ -partículas de látex sin ristocetina en muestras con diferente concentración de VWF, las cuales habían sido diluidas previamente con plasma deficiente de VWF o con regulador de pH, y en presencia de diversas concentraciones de Thesit en la preparación de ensayo (véase el ejemplo 5, aunque Thesit en lugar de Tween® 20, 45 mL de muestra).

15 Los ejemplos descritos a continuación sirven para ilustrar de manera ejemplar aspectos individuales de este invención y no deben entenderse como limitantes.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1:** clonación del constructo de GPIIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3xFlag)-(6xHis)

20 El vector de expresión pIRES neo2 (BD Biosciences, Clontech, Art.-No.: 6938-1) se modificó de tal manera que contuviera una etiqueta 33Flag-Tag y una 6xHis-Tag entre los sitios de corte de restricción NotI. Corriente arriba (5') de las secuencias Tag, se insertó un fragmento de codificación del péptido de señal (SEQ ID NO: 2) y los aminoácidos 1-285 del receptor de GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO: 1), el cual contenía un codón de codificación de valina en los sitios de codificación de las posiciones de aminoácidos 233 y 239 respectivamente.

**Ejemplo 2:** Expresión de la proteína de fusión GPIIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(33Flag)-(63His) recombinante en células HEK

25 Células HEK 293 (células de riñón humano embrionario; número ATCC: CRL-1573; Cell Lines Service CLS, Heidelberg) se transformaron con el constructo descrito en el ejemplo 1.

Las células se cultivan en:

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

30 + 10% FBS Origin EU (Art.-No.:10270-106, Invitrogen), que se desactivó al calor, o sino en 10% FBS Origin EEUU (Art.-No.:A15-003, Lot-No.:A01123-678, PAA)

+ 1% solución antibiótica-antimicótica (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 geneticina activa (Art.-No.:10131-027, Invitrogen)

Para la expresión (producción):

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

+ 0,5% solución antibiótica-antimicótica (100x) (Art.-No.:P11-002, PAA)

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

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

y sin geneticina

40 El procedimiento es tal como sigue:

- 1) descongelamiento de las células (1 Kryo con 5-10x 10e6 células) y cultivo en T175 en medio que contiene suero durante 96h
- 2) dividir en 4x T175 y cultivo durante 72-96h
- 3) dividir en 25x T175 y cultivo durante 72-96h
- 5 4) dividir una T175 y seguir cultivando como reserva. Dividir las restantes 24x T175 en 3x CellStack Corning (de a 10 niveles de CellStack en total con 6360cm<sup>2</sup>) y cultivar durante 72h
- 5) retirar medio monocapa con DMEM sin FBS 1-2x lavar y adicionar OPTIPRO-SFM libre de suero (1,8 litros por CellStack) y cultivar durante 96h
- 10 6) cosecha del medio. Centrifugar sobrenadante y recuperar el comprimido de las células desprendidas y devolverlas al CellStack con OPTIPRO-SFM recién hecho y cultivar durante 96h
- 7) tal como en 6)
- 8) cosecha final del medio y finalización del cultivo

**Ejemplo 3:** aislamiento por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión-GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(33Flag)-(63His)

- 15 El medio que contiene GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(3xFlag)-(6xHis) obtenida según el ejemplo 2 se libera de las células o de partes de la ruptura de células 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 ultrafiltración tangencial usando un casete de ultrafiltración con un límite de separación de 10 kDa (PES 10, Schleicher & Schüll, Alemania) a 1/10 del volumen de partida.
- 20 La purificación se efectúa por medio de cromatografía de afinidad usando una Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa (His Prep FF16/10, GE Healthcare, Suecia) según las indicaciones del fabricante. Para enlazar la GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(33Flag)-(63His) al sobrenadante concentrado se adicionan NaCl de 500 mmol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 20 mmol e imidazol de 5 mM y adicionando HCl de 5 M se ajusta el valor de pH a 7,4. Los componentes no enlazados se retiran lavados enjuagando la columna con un regulador de pH hecho de NaCl de 500 mmol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 20 mmol, imidazol de 5 mM, pH 7,4. La elución de la GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(33Flag)-(6xHis) enlazada se efectúa con un regulador de pH hecho de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 20 mmol, NaCl de 500 mmol, imidazol de 500 mMol, pH 7,4. El material eluido obtenido de esta manera se concentra en una celda de ultrafiltración con agitación, con una membrana de ultrafiltración, límite de separación de 10 kDa (OMEGA 10 K, Pall Life Sciences, USA) a 1/10 del volumen de partida. La otra purificación y separación de contaminantes se efectúa por medio de filtración en gel usando una columna de cromatografía Superdex 200 grado preparativo 35/600 (GE Healthcare, Suecia) de acuerdo con indicaciones del fabricante. La cromatografía se efectúa con una tasa de flujo de 5,0 ml/min usando un regulador de pH hecho de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 0,048 mol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de 0,02 mol/L, NaCl de 0,145 mol/L, NaN<sub>3</sub> de 0,015 mol/L, pH 7,2. Después de cargar la muestra, GPIb $\alpha$ -(G233V/M239V)-(33Flag)-(63His) se eluye en un pico después de un volumen de elución de alrededor de 300 ml de la columna de cromatografía empleada.
- 30
- 35 **Ejemplo 4:** (no es parte de la invención): método para determinar la actividad de VWF en un anti-FLAG/GPIb $\alpha$ -ELISA sin ristocetina

- 40 Se utilizaron placas de ELISA, las cuales ya estaban recubiertas con un anticuerpo contra la etiqueta Flag-Tag (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos, ANTI-FLAG HS, M2 coated 96-well Plates (clear), número de producto P 2983). En cada cavidad de la placa de ELISA se colocaron 100  $\mu$ L de una solución de regulador de pH a base de fosfato, que contenía proteína de fusión - GPIb $\alpha$ -(33Flag)-(63His) de tipo silvestre recombinante (sobrenadante del medio de cultivo diluido 1:10 después de la sedimentación de las células) o proteína de fusión GPIb $\alpha$ -(aa1-285,G233V/M239V)-(33Flag)-(63His) recombinante aislada (véase Ejemplo 3) en una concentración de 2,4 mg/mL, y fue incubada por una noche a 2-8 °C. Después de lavar 4 veces con regulador de pH a base de fosfato (+ 0,01 % Tween®) se adicionaron 50  $\mu$ L de una dilución de Hämate® (ZLB Behring, Marburg, Alemania) en regulador de pH a base de fosfato + 0,1 % del albúmina de suero bovino, así como 50  $\mu$ L de una opción de ristocetina en regulador de pH de fosfato + 0,1 % de albúmina de suero bovino. Después se efectuó una incubación por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 4 veces tal como anteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L de un anticuerpo anti-VWF acoplado a peroxidasa de rábano picante (horseradish) (Rabbit Anti- Human VWF/HRP, DAKO, Ref. P0226), se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó tal como anteriormente. A continuación se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de tetrametilbencidina en calidad de sustrato (sustrato de TMB, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania, Ref. 450684). Se incubó por 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.
- 50

- 5 En ausencia de ristocetina se efectuó un enlazamiento de VWF, fuerte y dependiente de la concentración, usando GPIIb/IIIa mutante, preparada según los ejemplos 1-3. Adicionando ristocetina se incrementó muy poco este enlazamiento, lo cual puede atribuirse probablemente a un enlazamiento no específico que también tiene lugar sin GPIIb/IIIa. Por lo contrario, un enlazamiento de VWF similarmente fuerte en la GPIIb/IIIa de tipo silvestre puede lograrse solamente adicionando 1,2 mg/mL de ristocetina. Sin adición de ristocetina no tienen lugar en lo absoluto un enlazamiento al usar GPIIb/IIIa de tipo silvestre (Figura 1).

**Ejemplo 5:** método según la invención para determinar la actividad de VWF en un ensayo de aglutinación de GPIIb/IIIa-partículas de látex sin ristocetina

Se prepararon tres reactivos:

- 10 Reactivo 1:

El anticuerpo anti-GPIIb/IIIa monoclonal VM16d (Sanbio B.V., Uden, Países Bajos: número de producto MON 11-46) fue enlazado a la superficie de las partículas de látex y las partículas fueron re suspendidas en un regulador de pH para almacenamiento de largo plazo (TRIS de 0,6 g/L, 1,1 % de leucina, 12,5 % de sacarosa, 0,05 % de HSA, gentamicina de 6,25 mg/L y anfotericina de 0,625 mg/L, pH 8.25, concentración de látex 0,22 %).

- 15 Reactivo 2:

Plasma deficiente de VWF

Reactivo 3:

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

- 20 2,5 mL de una solución al 7,5 % de polivinilpirrolidona (PVP) (Fluka, Alemania) en regulador de pH a base de fosfato (pH 7,1), 12,9 mL (0,625 mg/mL) de reactivo de bloqueo heterofílico 1 (Scantibodies Laboratory Inc, Santee, CA 92071, Estados Unidos) en regulador de pH Tris (pH 7,1), 3,4 mL de una solución con 21 g/L Tween® 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) en regulador de pH a base de fosfato (pH 7,2), 0,086 mL de una solución de 5,59 mg/mL de GPIIb/IIIa-(G233V/M239V)-(33Flag)-(63His) recombinante (véase Ejemplo 3) en regulador de pH base de fosfato (pH 7,1), y 11,2 mL de regulador de pH base de fosfato (pH 7,1).

- 25 La realización del ensayo se efectuó en el aparato automático de análisis de coagulación BCS® (Behring Coagulation System, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Se mezclaron 15 µL de una muestra de citrato plasma humano, 30 µL de reactivo 2 y 70 µL de reactivo 3. El inicio de la reacción se efectuó adicionando y mezclando con 40 µL 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.

- 30 Para calcular la actividad de VWF se elaboró una curva de calibración utilizando plasma humano estándar (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Como valor de referencia de VWF se utilizó el valor declarado de ristocetina-cofactor para el sistema BCS®. Incrementando el volumen de plasma humano estándar al mismo tiempo que reduciendo la cantidad correspondiente de reactivo 2 se generaron actividades de VWF hasta 200%. Diluyendo el plasma humano estándar con el reactivo 2 se generaron actividades más bajas de VWF. En la figura 2 se encuentra representada una curva típica de calibración. La actividad de VWF de una muestra puede leerse en la curva de calibración con ayuda de la velocidad de reacción averiguada.

- 35 En una preparación de ensayo para medir actividades de VWF particularmente bajas en una muestra, en lugar de 15 o 30 µL de muestra (véase previamente) se utilizaron 45 µL de muestra. Durante la calibración el plasma humano estándar se diluyó con el reactivo 2 de tal manera que se generaron actividades bajas de VWF de hasta 3% (véase la figura 3). Esta preparación de ensayo permite la determinación exacta de actividades de VWF extremadamente bajas, lo cual es particularmente importante en la formación de proporciones de actividad de VWF/antígeno a fin de clasificar los subtipos del síndrome de Von Willebrand. Incrementando la concentración de PVP a 0,35% en la preparación y del volumen de muestra a 60 µL, la aglutinación dependiente de VWF puede efectuarse además una diferenciación de VWF de 1% y VWF de 0%. De esta manera, con gran seguridad puede distinguirse una enfermedad de Von Willebrand tipo 3 (0% de VWF) de deficiencias extremadamente fuertes de otros tipos (por ejemplo 1-5 %).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Dade Behring Marburg GmbH

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

5 <130> 2007/B005- Ma 1289

<150> DE 10 2007 031 708.7

<151> 2007-07-06

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 610

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 554 162 T3

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  
 Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr  
 165 170 175

ES 2 554 162 T3

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe  
 180 185 190  
 Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu  
 195 200 205  
 Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala  
 210 215 220  
 Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Gly Val Asp Val Lys Ala Met Thr  
 225 230 235 240  
 Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val  
 245 250 255  
 Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp  
 260 265 270  
 Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys  
 275 280 285  
 Val Arg Ala Thr Arg Thr Val Val Lys Phe Pro Thr Lys Ala His Thr  
 290 295 300  
 Thr Pro Trp Gly Leu Phe Tyr Ser Trp Ser Thr Ala Ser Leu Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Gln Met Pro Ser Ser Leu His Pro Thr Gln Glu Ser Thr Lys Glu Gln  
 325 330 335  
 Thr Thr Phe Pro Pro Arg Trp Thr Pro Asn Phe Thr Leu His Met Glu  
 340 345 350  
 Ser Ile Thr Phe Ser Lys Thr Pro Lys Ser Thr Thr Glu Pro Thr Pro  
 355 360 365  
 Ser Pro Thr Thr Ser Glu Pro Val Pro Glu Pro Ala Pro Asn Met Thr  
 370 375 380  
 Thr Leu Glu Pro Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Pro Ala Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Pro Ile Pro Thr Ile  
 405 410 415  
 Ala Thr Ser Pro Thr Ile Leu Val Ser Ala Thr Ser Leu Ile Thr Pro  
 420 425 430

ES 2 554 162 T3

Lys Ser Thr Phe Leu Thr Thr Thr Lys Pro Val Ser Leu Leu Glu Ser  
 435 440 445

Thr Lys Lys Thr Ile Pro Glu Leu Asp Gln Pro Pro Lys Leu Arg Gly  
 450 455 460

Val Leu Gln Gly His Leu Glu Ser Ser Arg Asn Asp Pro Phe Leu His  
 465 470 475 480

Pro Asp Phe Cys Cys Leu Leu Pro Leu Gly Phe Tyr Val Leu Gly Leu  
 485 490 495

Phe Trp Leu Leu Phe Ala Ser Val Val Leu Ile Leu Leu Leu Ser Trp  
 500 505 510

Val Gly His Val Lys Pro Gln Ala Leu Asp Ser Gly Gln Gly Ala Ala  
 515 520 525

Leu Thr Thr Ala Thr Gln Thr Thr His Leu Glu Leu Gln Arg Gly Arg  
 530 535 540

Gln Val Thr Val Pro Arg Ala Trp Leu Leu Phe Leu Arg Gly Ser Leu  
 545 550 555 560

Pro Thr Phe Arg Ser Ser Leu Phe Leu Trp Val Arg Pro Asn Gly Arg  
 565 570 575

Val Gly Pro Leu Val Ala Gly Arg Arg Pro Ser Ala Leu Ser Gln Gly  
 580 585 590

Arg Gly Gln Asp Leu Leu Ser Thr Val Ser Ile Arg Tyr Ser Gly His  
 595 600 605

Ser Leu  
 610

<210> 2

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 554 162 T3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 41

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de señal heteróloga

<400> 3

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu  
20 25 30

Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg  
35 40

**REIVINDICACIONES**

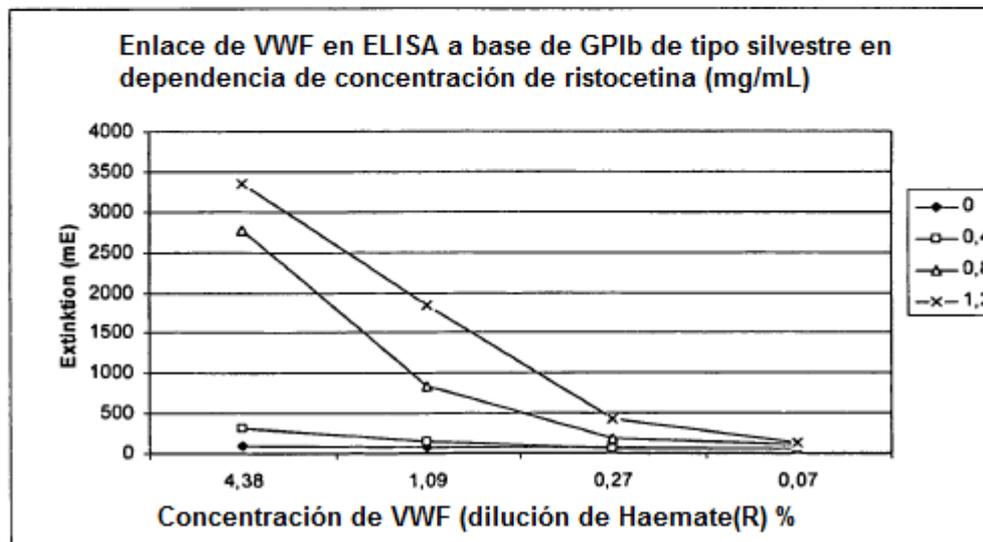
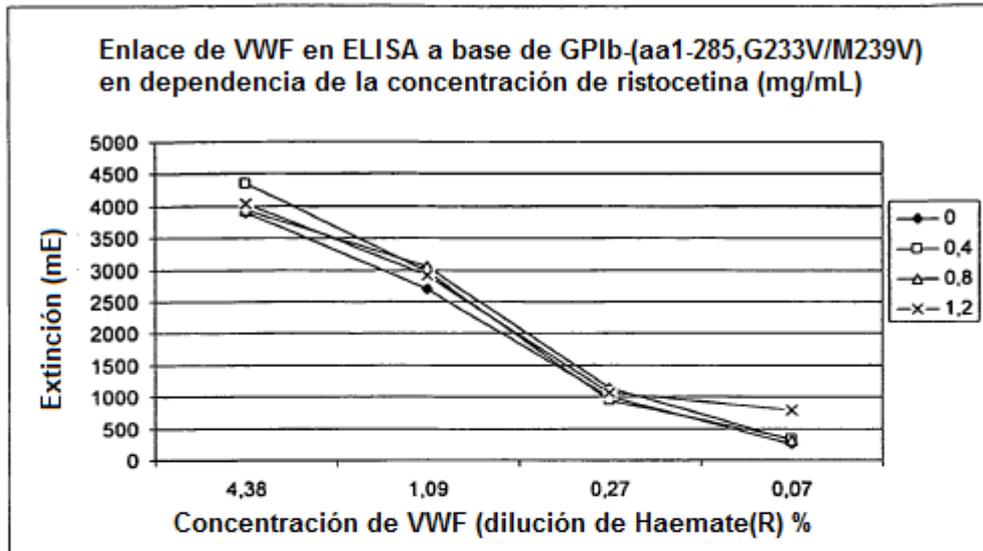
1. Método para la determinación de la actividad del factor de von Willebrand (VWF) en una muestra, en el cual la muestra se mezcla con una proteína GPIIb $\alpha$  aislada para producir una preparación de ensayo, el cual está caracterizado porque
- 5 a) se utiliza proteína GPIIb $\alpha$  aislada, la cual comprende una secuencia de aminoácidos que en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO:1) contiene al menos los residuos de aminoácidos 1-268 y presenta una sustitución de aminoácidos Xaa en las posiciones 233 y 239, respectivamente, y porque
- b) a la preparación de ensayos no se adiciona ristocetina ni botrocetina y porque
- 10 c) la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está asociada con una fase sólida en forma de partículas.
2. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque a la preparación de ensayo no se adiciona ninguna sustancia equivalente a ristocetina o a botrocetina.
3. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la sustitución de aminoácidos Xaa en la posición 233 y/o la posición 239 de la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada consiste en un residuo valina o un residuo serina.
- 15 4. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada se prepara de modo recombinante o sintético.
5. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está fusionada en el terminal N con la secuencia de señal de GPIIb $\alpha$  homóloga, humana (SEQ ID NO: 2) o una secuencia de señal heteróloga.
- 20 6. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está fusionada en el terminal C con una o varias etiquetas de afinidad.
7. Método según la reivindicación 6 caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está fusionada en el terminal C con una o varias etiquetas de afinidad del grupo de las etiquetas His-Tag, Flag-Tag, Arg-Tag, c-Myc-Tag y Strep-Tag.
- 25 8. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la proteína utilizada GPIIb $\alpha$  está asociada con la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo.
9. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está asociada con la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$ .
- 30 10. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  está asociada con la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo anti-etiqueta de afinidad.
11. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la fase sólida en forma de partículas está compuesta de látex.
12. Método según una de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la actividad de VWF se determina por medio de la aglutinación de la fase sólida en forma de partículas, facilitada por GPIIb $\alpha$ .
- 35 13. Método según la reivindicación 12 caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está asociada con la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  monoclonal del grupo de VM16d y SZ 2.
14. Método según la reivindicación 12 caracterizado porque la proteína GPIIb $\alpha$  utilizada está fusionada con una o varias etiquetas Flag-tags en el terminal C y está asociada con la fase sólida en forma de partículas por medio de un anticuerpo anti-Flag.
- 40 15. Método según una de las reivindicaciones 12 a 14 caracterizado porque la preparación de ensayo contienen un detergente, preferiblemente un detergente del grupo de Tween® 20, Thesit, detergente Triton y dodecilsulfato de sodio.
16. Método según la reivindicación 15 caracterizado porque la preparación de ensayo contienen Tween® 20 en una concentración de 0,02 g/L a 20 g/L.
- 45

17. Método según una de las reivindicaciones 1 a 16 caracterizado porque la muestra es un líquido biológico de origen humano o animal.

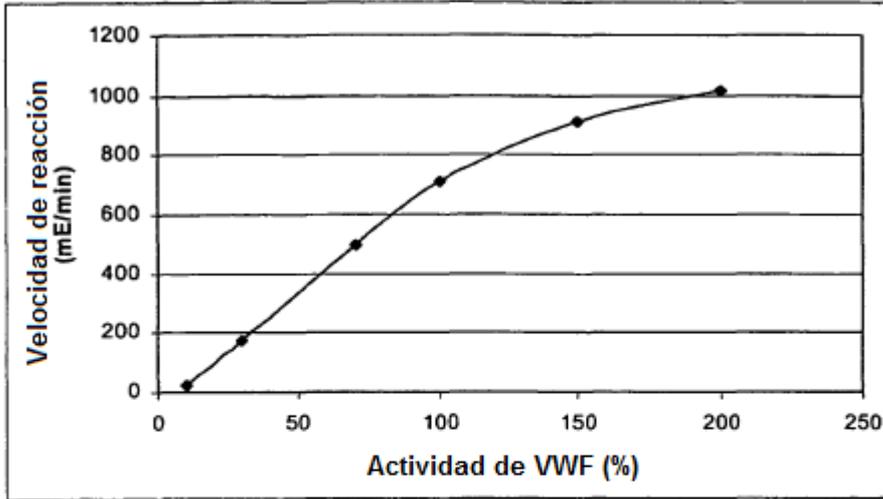
18. Método según una de las reivindicaciones 1 a 16 caracterizado porque la muestra es una mezcla de reacción que se compone de un líquido biológico, al cual se adiciona VWF aislado en calidad de sustrato.

- 5 19. Kit de ensayo para realizar un método según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene un reactivo, el cual contiene proteína GPIb $\alpha$ , la cual comprende una secuencia de aminoácidos que en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la proteína GPIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO:1) contiene al menos los residuos de aminoácidos 1-268 y presenta una sustitución de aminoácidos Xaa en las posiciones 233 y 239, respectivamente, y la cual está asociada con una fase sólida en forma de partículas.

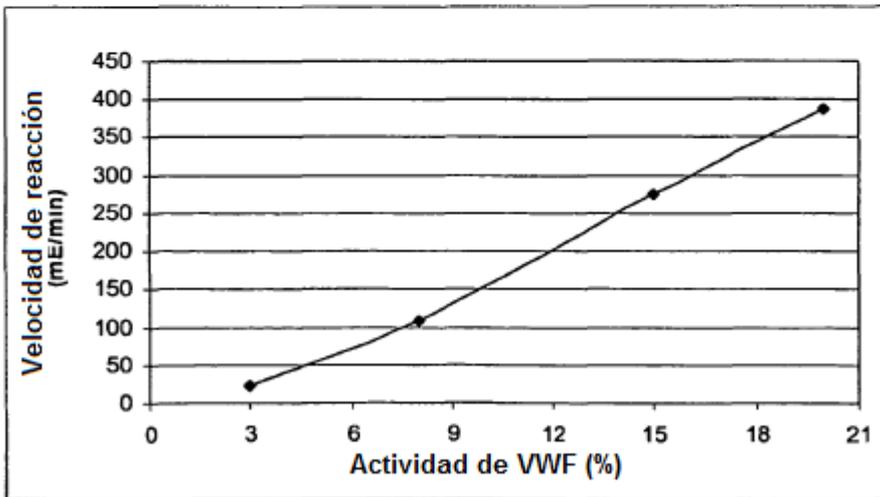
**Figura 1**



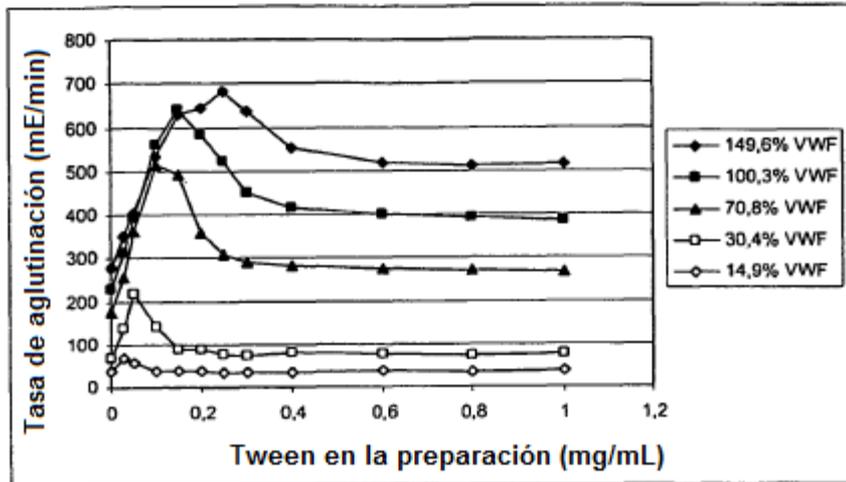
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

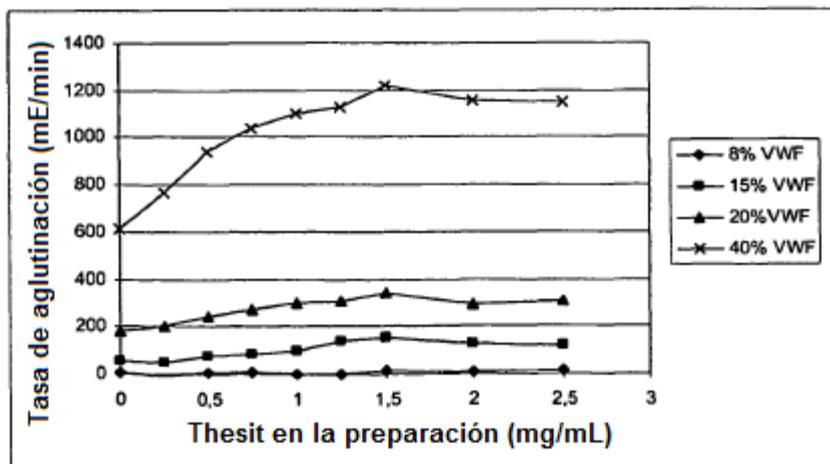


Figura 6

