

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 506**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09748289 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2342351**

54 Título: **Método de test de control de calidad de una muestra que contiene factor XIII**

30 Prioridad:

24.10.2008 EP 08167476

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**ANDERSEN, METTE DAHL;
KRISTIANSEN, GUNHILD K.;
SVANE, PERNILLE CHARLOTTE;
HØRLYCK, LENE y
SCHRØDER, METTE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 506 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 de test de control de calidad de una muestra que contiene factor XIII

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método de test de control de calidad de una muestra que contiene Factor XIII (FXIII) que comprende el paso de detectar la presencia de y/o medir la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa⁰) en dicha muestra y a un kit de control de calidad para determinar la calidad de una muestra que contiene Factor XIII (FXIII).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una interacción compleja de diversos componentes (o factores) de la sangre que da lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes de la sangre, que participan en lo que se ha denominado la "cascada" de la coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (lo cual en sí mismo es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que han sufrido una conversión de este tipo se conocen generalmente como "factores activos", y se designan por la adición de la letra "a" al nombre del factor de coagulación (v.g., Factor XIIIa).

15

20

FXIII se encuentra predominantemente en la forma de zimógeno en cualesquiera de FXIII recombinante (FXIII-A₂), FXIII plasmático (FXIII-A₂B₂) o FXIII intracelular (FXIII-A₂). En el plasma, durante la coagulación de la sangre, predomina el camino de activación de la trombina. La trombina escinde un péptido de activación de 37 residuos de aminoácido de la parte N-terminal de cada subunidad FXIII-A y en presencia de Ca²⁺ genera la forma activa FXIIIa⁰. Inversamente, El FXIII intracelular no es accesible a la trombina y se ha observado que ocurre activación no proteolítica en ciertas condiciones para producir una especie FXIIIactiva, (FXIIIa⁰) que contiene la totalidad de los aminoácidos 1-731 en cada subunidad FXIII-A y por tanto no ha sido escindida por trombina activada (Polgar et al. (1990) Biochem. J. 267, 557-560).

25

30

Para pacientes con hemofilia grave, se administran factores de coagulación de la sangre, tales como FXIII para ayudar al proceso de coagulación de la sangre. FXIII debe administrarse en su forma inactiva/zimógeno, que se activará naturalmente en primer lugar *in vivo* a demanda, v.g. cuando ocurre una laceración. Como un parámetro de calidad del producto, el contenido de FXIII preactivado (FXIIIa⁰) precisa ser medido y mantenerse en un mínimo. Sin embargo, existe una probabilidad de que ciertas cantidades de FXIII puedan activarse no proteolíticamente a FXIIIa⁰ en una formulación farmacéutica, lo que podría aumentar por consiguiente el riesgo de coagulación inespecífica.

35

Existe por tanto una gran necesidad de un método de medida de la calidad de una formulación que contenga FXIII para asegurar la seguridad de productos de FXIII y asegurar que el tratamiento de la hemofilia está optimizado.

40

La publicación Karges H.E. et al., Seminars in Thrombosis and Hemostasis (1996) vol. 22, No. 5, páginas 427-436, propugna el ensayo de preparaciones terapéuticas del factor XIII respecto a la presencia de agentes infecciosos (por ejemplo, virus) como procedimiento para controlar la calidad (seguridad) de las preparaciones (véase el resumen)

45

SUMARIO DE LA INVENCION

Conforme a un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de ensayo del control de calidad de una muestra que contiene Factor XIII (FXIII) que comprende el paso de detección de la presencia de y/o la medida de la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa⁰) en dicha muestra.

50

Conforme a un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit de control de calidad para determinar la calidad de una muestra que contiene Factor XIII (FXIII) que comprende la detección de FXIII preactivado (FXIIIa⁰) y/o la medida de los componentes e instrucciones para utilizar dicho kit conforme a los métodos que se definen en esta memoria.

55

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la potencia de FXIII y el % de FXIIIa⁰ medidos en presencia de cantidades variables de Ca²⁺. Los paneles de la izquierda muestran %FXIIIa⁰, y los paneles de la derecha muestran la potencia relativa. Los paneles superiores muestran Ca²⁺ desde 0,05 mM a 5 mM y los paneles inferiores muestran Ca²⁺ desde 1 mM a 50 mM;

60

la **Figura 2** muestra la potencia de FXIII y el % de FXIIIa^o medidos en presencia de cantidades variables de NaCl. El panel izquierdo muestra %FXIIIa^o, y el panel derecho muestra la potencia relativa normalizada a NaCl 150 mM;

5 la **Figura 3** muestra la potencia, FXIIIa^o y %FXIIIa^o medidos en función del pH. El panel superior izquierdo es la actividad de FXIIIa^o en RFU/s/nM, el panel inferior izquierdo es la potencia relativa en función del pH y el panel superior derecho es el % de FXIIIa^o resultante. La potencia relativa está normalizada para pH 7,4;

10 la **Figura 4** muestra la influencia del componente tampón en la potencia, FXIIIa^o y %FXIIIa^o. El panel superior izquierdo demuestra actividad de FXIIIa^o en RFU/s/nM, el panel inferior izquierdo demuestra la potencia relativa en función del tampón y Ca²⁺, y el panel superior derecho demuestra el %FXIIIa^o resultante. Todos los ensayos se realizaron a pH 7,4 en el componente tampón y Ca²⁺ 1 ó 5 mM como se indica. La potencia relativa se normalizó a Hepes con CaCl₂ 1 mM;

15 la **Figura 5** muestra cromatogramas HPLC de intercambio aniónico con FXIII-A₂ zimógeno (Figura 5A) y FXIIIa^o activado (Figura 5B); y

20 la **Figura 6** muestra el principio del ensayo que muestra la señal de FXIII + trombina y en ausencia de trombina. En presencia de FXIII no se detecta aumento alguno en la fluorescencia a lo largo del tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Conforme a un primer aspecto de la invención, se proporciona un método en ensayo de control de calidad de una muestra que contiene Factor XIII (FXIII) que comprende el paso de detectar la presencia de y/o medir la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^o) en dicha muestra.

30 La invención proporciona un método para medir la actividad de FXIII en ausencia de trombina, por lo que tanto FXIIIa^o como FXIIIa ya formado en una muestra producirán señal. Esta actividad se conoce como FXIIIa, dado que el mecanismo de activación no se distingue. En realidad, FXIIIa* se detecta fácilmente por métodos estándar de HPLC y MS dado que aquél tiene una masa diferente de FXIII. Además, la generación de FXIIIa* se evita fácilmente en las preparaciones farmacéuticas de FXIII. En contraste, FXIIIa^o tiene una masa idéntica a la de FXIII y por tanto es más difícil de detectar por métodos estándar. En ausencia de FXIIIa* en las muestras, el método de ensayo enzimático determina los niveles de FXIIIa^o.

35 La invención proporciona ventajas importantes con respecto a la determinación exacta y sensible de FXIII preactivado que se ha encontrado es esencial para evaluación y aseguramiento de la calidad de las muestras que contienen FXIII. En particular, se ha encontrado que los métodos de la invención son capaces de detectar cantidades traza de FXIII preactivado entre FXIII zimógeno con una sensibilidad de aproximadamente 0,1 %. La invención proporciona por tanto una determinación exacta de la calidad y eficacia de una formulación dada que contiene FXIII que está correlacionada directamente con la cantidad de FXIII preactivado presente en la formulación. Por ejemplo, podría pensarse que lotes de formulaciones que contienen FXIII podrían rechazarse si una muestra de una formulación contuviera más de cierto porcentaje de FXIII preactivado (v.g. más de 0,3, 0,6, 1 ó 2 %).

45 Las referencias en esta memoria a "FXIII preactivado" o "FXIII^o" se refieren ambas a FXIII que ha sido activado no proteolíticamente en ausencia de trombina. Las referencias en esta memoria a "FXIII activado" se refieren a FXIII que ha sido activado proteolíticamente en presencia de trombina.

En una realización, la presencia de FXIIIa^o en dicha muestra se detecta por separación cromatográfica.

50 Conforme a un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de detectar la presencia de y/o medir la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^o) que comprende un paso de separación cromatográfica.

En una realización, la separación cromatográfica comprende HPLC de intercambio aniónico.

55 Se ha encontrado que FXIII zimógeno y FXIIIa^o tienen perfiles de elución y tiempos de retención diferentes. Por ejemplo, puede verse en la Figura 5 que FXIII zimógeno tiene un tiempo de retención de 7,1 minutos (Figura 5A) y FXIIIa^o tiene un tiempo de retención de 10,4 minutos (Figura 5B). El método de intercambio de anión es capaz de detectar los FXIII y FXIIIa^o como dos picos de referencia basales separados. Las fracciones eluidas obtenidas del pico representado en la Figura 5B se recogieron y testaron respecto a actividad de FXIIIa^o conforme al ensayo descritos en esta memoria y se encontró que contenían 100% de FXIIIa^o. Se ha demostrado ventajosamente que el límite de detección de FXIIIa^o es tan pequeño como 0,1-0,2 % de FXIIIa^o, lo que indica que la técnica de separación cromatográfica es a la vez un método de control de calidad sensible y rápido. Adicionalmente, el método de detección cromatográfica es capaz también de medir FXIIIa^o sin interferencia de cualquiera de los componentes del ensayo, eliminando por tanto la posibilidad de activación *in situ* durante el análisis.

5 En una realización de la separación cromatográfica, la HPLC de intercambio aniónico comprende el uso de una columna de intercambio aniónico tal como una columna DEAE-anión o Q-anión. En una realización adicional, la columna de intercambio aniónico comprende una columna DEAE-anión (v.g. TSKgel DEAE-NPR (Tosoh Bioscience LLC)).

Será inmediatamente evidente para la persona experta que el paso de separación cromatográfica podría llevarse a cabo conforme a procedimientos conocidos, por ejemplo el uso de tampones de equilibración y elución.

10 Se apreciará que los tampones de equilibración y elución se seleccionarán deseablemente basándose en la imposibilidad de formar sales insolubles, tales como sales de calcio. Así, en una realización de la separación cromatográfica, los tampones de equilibración y elución comprenden Tris a una concentración comprendida entre 20 y 100 mM (v.g. 50 mM).

15 En una realización de la separación cromatográfica, los tampones de equilibración y elución están tamponados a un pH comprendido entre 7 y 8 (v.g. 7,5).

20 En una realización de la separación cromatográfica, los tampones de equilibración y elución contienen al menos Ca^{2+} 2 mM. En una realización adicional, los tampones de equilibración y elución contienen entre Ca^{2+} 3 mM y 5 mM.

En una realización de la separación cromatográfica, el paso de elución se realiza por aumento de la concentración iónica, lo que puede lograrse aumentando la concentración de una sal seleccionada, por ejemplo, NaCl entre 200 mM y 700 mM (v.g. 500 mM).

25 En una realización, el método comprende adicionalmente los pasos de detectar la presencia de FXIII preactivado (FXIIIa^0) y medir la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^0) en dicha muestra.

En una realización, el paso de medida de la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^0) comprende medir la actividad de FXIII en presencia y ausencia de trombina.

30 Conforme a un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de medida de la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^0) que comprende medir la actividad de FXIII en presencia y ausencia de trombina.

35 Este aspecto de la invención permite calcular el porcentaje de FXIII preactivado como porcentaje de actividad de FXIII total. La actividad total medida después de la adición de trombina está comprendida por la actividad generada por la activación por trombina más la preactivada ya presente en la muestra (en su caso). Por ejemplo:

$$40 \quad \% \text{FXIIIa}^0 = \frac{\text{FXIII preactivado (actividad de FXIII en ausencia de trombina)}}{\text{FXIII activado (actividad de FXIII en presencia de trombina)}} \times 100$$

En una realización, el paso de medida de FXIII activado/preactivado comprende el análisis de presencia de un sustrato de FXIII, es decir análisis fluorescente o no fluorescente (es decir de absorción de luz).

45 En una realización, el paso de medida de FXIII activado/preactivado comprende análisis fluorométrico en presencia de un sustrato fluorescente.

50 En una realización adicional, el sustrato fluorescente es uno que puede ser escindido por una trans-glutaminasa. En otra realización adicional, el sustrato fluorescente es Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLK (ZEDIRA GmbH, Roesslerstrasse 83, D-64293 Darmstadt, Alemania - Número de Producto - A101). Conforme a un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLK en la medida de FXIII preactivado (FXIIIa^0).

55 Sin quedar ligados por la teoría, se cree que en presencia de un éster etílico de glicina, FXIII escinde un apagador (Cad-Dnp) de la cadena lateral de Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLK e incorpora dicho grupo éster.

En una realización adicional, se mide FXIII activado/preactivado conforme a los métodos descritos en WO 2006/018164 (N-Zyme Biotec GmbH).

60 En una realización, se mide FXIII activado/preactivado en presencia de Ca^{2+} 0,5-10 mM. En una realización adicional, se mide FXIII activado/preactivado en presencia de Ca^{2+} 1-2 mM. Se ha encontrado que es deseable mantener la concentración de calcio por debajo de 2 mM debido a que la determinación de $\% \text{FXIIIa}^0$ depende de la concentración de calcio (lo que puede verse por el análisis que se muestra en la Figura 1). En una realización

adicional, se mide FXIIIactivado/preactivado en presencia de Ca^{2+} 2 mM. El beneficio de seleccionar Ca^{2+} 2 mM es que este valor está próximo al valor fisiológico y por consiguiente mimetiza mejor la situación *in vivo*.

5 En una realización, el ion Ca^{2+} estará presente como Ca^{2+} estándar de absorción atómica (lo cual puede adquirirse de Fluka o Sigma-Aldrich). La ventaja de la utilización de Ca^{2+} estándar de absorción atómica es que la concentración de Ca^{2+} ha sido monitorizada con precisión y mantenida bajo control en condiciones ácidas. En contraste, las condiciones básicas causan indeseablemente la formación de hidróxido de calcio y óxido de calcio insolubles. Además, el Ca^{2+} estándar de absorción atómica no adolece de las desventajas demostradas por el polvo de cloruro de calcio. Por ejemplo, el polvo de cloruro de calcio capturará típicamente humedad de los alrededores y resultará rápidamente inexacto en cuanto al nivel de hidratación de la sal cloruro de calcio, impidiendo así la pesada exacta de una cantidad molar dada de Ca^{2+} .

15 Se apreciará que el tiempo transcurrido entre la incubación de la muestra con los componentes de ensayo y la medida de FXIIIactivado/preactivado debería ser mínimo a fin de minimizar el riesgo de activación no proteolítica de FXIII. Así, en una realización, el tiempo transcurrido entre la incubación de la muestra con los componentes de ensayo y la medida de FXIIIactivado/preactivado es menor que 1 hora.

20 En una realización, se mide FXIIIactivado/preactivado en presencia de NaCl 50-500 mM. En una realización adicional, se mide FXIIIactivado/preactivado en presencia de NaCl 100-200 mM. Se ha encontrado que es deseable controlar la concentración de NaCl en el ensayo debido a que %FXIIIa^o está influenciado por una concentración fluctuante de NaCl (lo cual puede verse por análisis que se muestra en la Figura 2). En otra realización adicional, la concentración de FXIII se mide en presencia de NaCl 150 mM. La ventaja de seleccionar NaCl 150 mM es que este valor está próximo al valor fisiológico y por tanto mimetiza mejor la situación *in vivo*.

25 En una realización, FXIIIactivado/preactivado se mide a un pH comprendido entre 6,5 y 10. En una realización adicional, se mide FXIIIactivado/preactivado a un pH comprendido entre 7 y 8. Se ha encontrado que es deseable controlar el pH del ensayo dado que se ha encontrado que el pH influye tanto en la potencia como en el % de FXIIIa^o (lo cual puede verse por el análisis que se muestra en la Figura 3). Por ejemplo, se ha encontrado que el sitio activo de FXIII* está influenciado por el pH. En otra realización adicional, se mide el FXIIIactivado/preactivado a un pH de 7,4. La ventaja de seleccionar un pH de 7,4 es que este valor está próximo al valor fisiológico y por tanto mimetiza mejor la situación *in vivo*.

35 Se apreciará que FXIIIactivado/preactivado se medirá generalmente en presencia de un tampón capaz de tamponar a un pH comprendido entre 7 y 8 (v.g. 7,4). En una realización, se mide FXIII activado/preactivado en presencia de tampón Hepes. El tampón recomendado para Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLLK es Tris 50 mM ajustado a pH 7,5 utilizando ácido clorhídrico. Sin embargo, se ha encontrado que la elección del tampón tiene un gran impacto tanto sobre la potencia como sobre el % de FXIIIa^o. Por ejemplo, se encontraron sorprendentemente valores inferiores de %FXIIIa^o para Hepes, lo que sugería que Tris puede inducir FXIIIa^o nuevo *in situ* (véase Figura 4). Esto es claramente inconveniente durante el ensayo de calidad, dado que un valor falso puede dar como resultado rechazar innecesariamente lotes de formulaciones que contienen FXIII. En una realización adicional, FXIIIactivado/preactivado se mide en presencia de tampón Hepes 50-200 mM (v.g. 100 mM).

45 En una realización, se mide FXIIIactivado/preactivado en presencia de un surfactante. En una realización adicional, el surfactante es un surfactante de polietilenglicol (v.g. PEG 8000). Cuando está presente, el surfactante estará presente típicamente en una cantidad comprendida entre 0,05 y 0,5% (v.g. 0,1 %).

50 Conforme a un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit de control de calidad para determinar la calidad de una muestra que contiene factor XIII (FXIII), que comprende componentes de detección y/o medida de FXIII preactivado (FXIIIa^o) e instrucciones para utilizar dicho kit conforme a los métodos que se definen en esta memoria.

55 En una realización, los componentes de detección comprenden una columna HPLC de intercambio aniónico, tal como una columna DEAE-anión (v.g. TSKgel DEAE-NPR). En una realización adicional, los componentes de detección comprenden adicionalmente tampones de equilibración y elución como se definen anteriormente en esta memoria.

60 En una realización, los componentes de medición comprenden un sustrato fluorescente como se define anteriormente en esta memoria (v.g. Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLLK). En una realización adicional, los componentes de medición comprenden adicionalmente Ca^{2+} (v.g. Ca^{2+} 2 mM o estándar de absorción atómica). En otra realización adicional, los componentes de medida comprenden adicionalmente NaCl 100-200 mM (v.g. NaCl 150 mM). En otra realización adicional, los componentes de medida comprenden adicionalmente tampón Hepes 50-200 mM (v.g. 100 mM) tamponado a un pH comprendido entre 6,5 y 10 (v.g. 7,4). En otra realización adicional, los componentes de medida comprenden además 0,05 y 0,5% (v.g. 0,1 %) de un surfactante (v.g. PEG 8000).

La invención se describirá a continuación con referencia a los Ejemplos no limitantes siguientes:

EJEMPLOS

5 **Ejemplo 1**

Detección de FXIIIa° por HPLC

10 Una muestra que contiene FXIII puede someterse a análisis por HPLC de intercambio aniónico con arreglo a las condiciones descritas en la Tabla 1 para detectar y cuantificar la presencia de FXIIIa°.

Tabla 1

Columna:	TSKgel DEAE-NPR 4,6 x 35 mm + guarda 4,6 x 5 mm
Temp. de la columna:	25 °C
Caudal:	1 ml/min
Tampón A:	Tris 50 mM, pH 7,5 + CaCl ₂ 3 mM
Tampón B:	Tris 50 mM, pH 7,5 + NaCl 500 mM + CaCl ₂ 5 mM
Gradiente:	T=0, 1 % B, T = 2 – 17,2 min, desde 1 % B a 27 % B, T = 17,2 – 19,2 min, isocrático a 27 % B, T = 19,2 – 19,7 min, desde 27 % B a 70% B, T=19,7 – 21,7 min desde 70% a 90% B y a T = 23,0 min de nuevo a tampón 1% B.
Temp. del tomamuestras automático	Temperatura ambiente, ~21 °C
Volumen de inyección:	~20 µl o 10 - 20 µg
Detección:	215 nm
Tiempo de ejecución:	32 min
El % de FXIIIa° se determina como el porcentaje de área del pico representativo de FXIIIa° del área integrada total de la muestra. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 5.	

15 **Ejemplo 2**

Medida fluorescente de la actividad de FXIIIa°

20 La actividad de FXIII en presencia de trombina se midió añadiendo típicamente una mixtura de reacción de 200 µl que contenía los componentes enumerados en la tabla 2 a una placa de microtitulación de 96 pocillos.

Tabla 2

Componente	Concentración final de ensayo
rFXIII	0-80 nM
Trombina	0,24 NIH/mL
Éster de etil-glicina 2,5 M (donante de amina)	10 mM
Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLK (sustrato)	30 µM
PEG8000	0,1 %
NaCl	150 mM
Ca ²⁺	2 mM
Tampón Hepes, pH 7,4	100 mM

25 Se midió luego la fluorescencia a una emisión de 418 nm y excitación de 313 nm. Típicamente, la fluorescencia se monitorizó en un lector de placas (v.g. SpectraMax Gemini EM de Molecular Devices) utilizando software SoftMaxPro.

5 La actividad de FXIII en ausencia de trombina se midió añadiendo típicamente una mixtura de reacción de 200 μ l que contenía los componentes enumerados en la tabla 3 a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se aseguró que las medidas de FXIII en presencia o ausencia de trombina se encontraran en la misma placa a fin de proporcionar la comparación más exacta de la señal fluorescente.

Tabla 3

Componente	Concentración final de ensayo
rFXIII	0-10 000 nM
Trombina	nula
Éster de etil-glicina 2,5 M (donante de amina)	10 mM
Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLLLK (sustrato)	30 μ M
PEG8000	0.1 %
NaCl	150 mM
Ca ²⁺	2 mM
Tampón Hepes, pH 7,4	100 mM

10 Se monitorizó luego la fluorescencia de una manera análoga a la arriba descrita, y los resultados pueden verse en la Figura 6. La actividad en presencia y ausencia de trombina se midió luego en RFU/s/Nm de FXIII (donde RFU son unidades de fluorescencia relativas) y se calculó %r FXIII^o como la ratio de las dos medidas.

15 El uso de los términos "un" y "uno(a)" y "el/la", "los/las" y referencias similares en el contexto de descripción de la invención debe interpretarse que abarca tanto el singular como el plural, a no ser que se indique otra cosa en esta memoria o esté en contradicción clara con el contexto. Por ejemplo, la expresión "el compuesto" debe entenderse como referencia a varios "compuestos" de la invención o aspecto particular descrito, salvo que se indique otra cosa.

20 Excepto que se indique otra cosa, todos los valores exactos proporcionados en esta memoria son representativos de valores aproximados correspondientes (v.g., todos los valores exactos ilustrativos proporcionados con respecto a un factor o medida particular puede considerarse que proporcionan también una medida aproximada correspondiente, modificada por el término "aproximadamente", en caso apropiado).

25 La descripción en esta memoria de cualquier aspecto o aspecto de la invención utilizando términos tales como "que comprende(n)", "que tiene(n)", "que incluye(n)", o "que contiene(n)" con referencia a uno o más elementos debe entenderse que proporciona un respaldo para un aspecto similar o aspecto de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" dicho elemento o elementos particulares a no ser que se especifique otra cosa o ello esté en contradicción clara con el contexto (v.g., una composición escrita en esta memoria como que comprende un elemento particular debería entenderse que describe también una composición constituida por dicho elemento, a no ser que se especifique otra cosa o ello esté claramente en contradicción con el contexto).

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de control de calidad para ensayo de una muestra que contiene FXIII, que comprende el paso de detectar la presencia de y/o medir la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^o) en dicha muestra.
2. Un método como se define en la reivindicación uno, en el cual la presencia de FXIIIa^o en dicha muestra se detecta por separación cromatográfica.
- 10 3. Un método como se define en la reivindicación 2, en el cual la separación cromatográfica comprende HPLC de intercambio aniónico.
4. Un método como se define en la reivindicación 3, en el cual la columna de intercambio iónico comprende una columna DEAE- anión tal como TSKgel DEAE-NPR.
- 15 5. Un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 en el que los tampones de equilibración y elución comprenden Tris a una concentración comprendida entre 20 y 100 mM (v.g. 50 mM).
- 20 6. Un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 el que los tampones de equilibración y elución están tamponados a un pH de comprendido entre 7 y 8, tal como 7,5.
7. Un método como se define en la reivindicación uno, que comprende los pasos de detectar la presencia de FXIII preactivado (FXIIIa^o) y medir la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^o) en dicha muestra.
- 25 8. Un método como se define en la reivindicación 7, en el cual el paso de medida de la concentración de FXIII preactivado (FXIIIa^o) comprende medir la actividad de FXIII en presencia (FXIIIactivado) y ausencia (FXIII preactivado) de trombina.
- 30 9. Un método como se define en la reivindicación 8, en el cual el paso de medida de FXIIIactivado/reactivado comprende el análisis fluorométrico en presencia de un sustrato de FXIII fluorescente o no fluorescente.
10. Un método como se define en la reivindicación 9, en el cual el sustrato fluorescente es Abz-NE(Cad-Dnp)EQVSPLTLK.
- 35 11. Un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el cual la concentración de FXIII se mide en presencia de un surfactante.

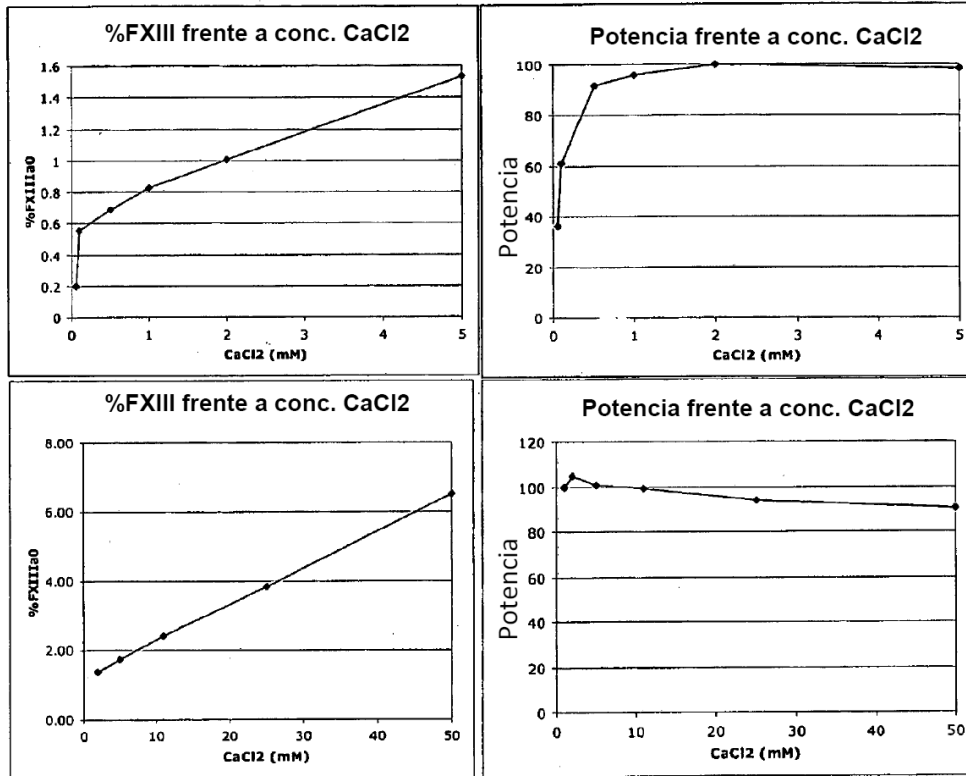


FIGURA 1

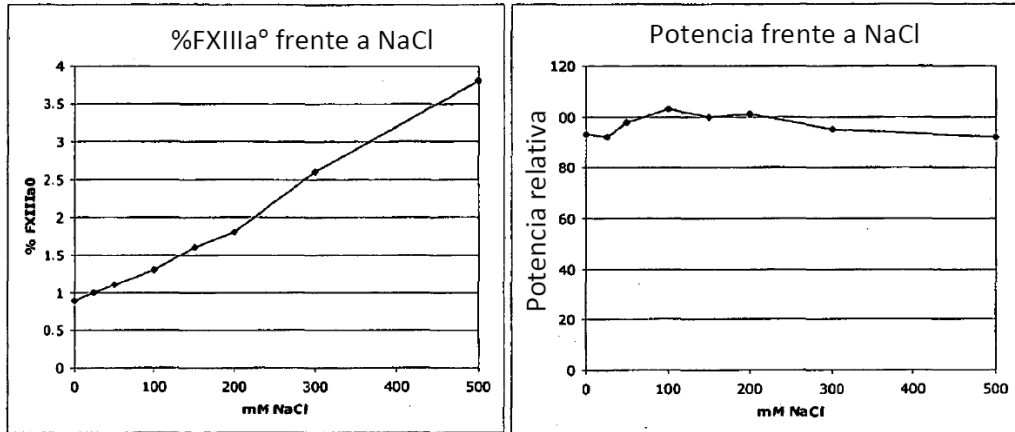


FIGURA 2

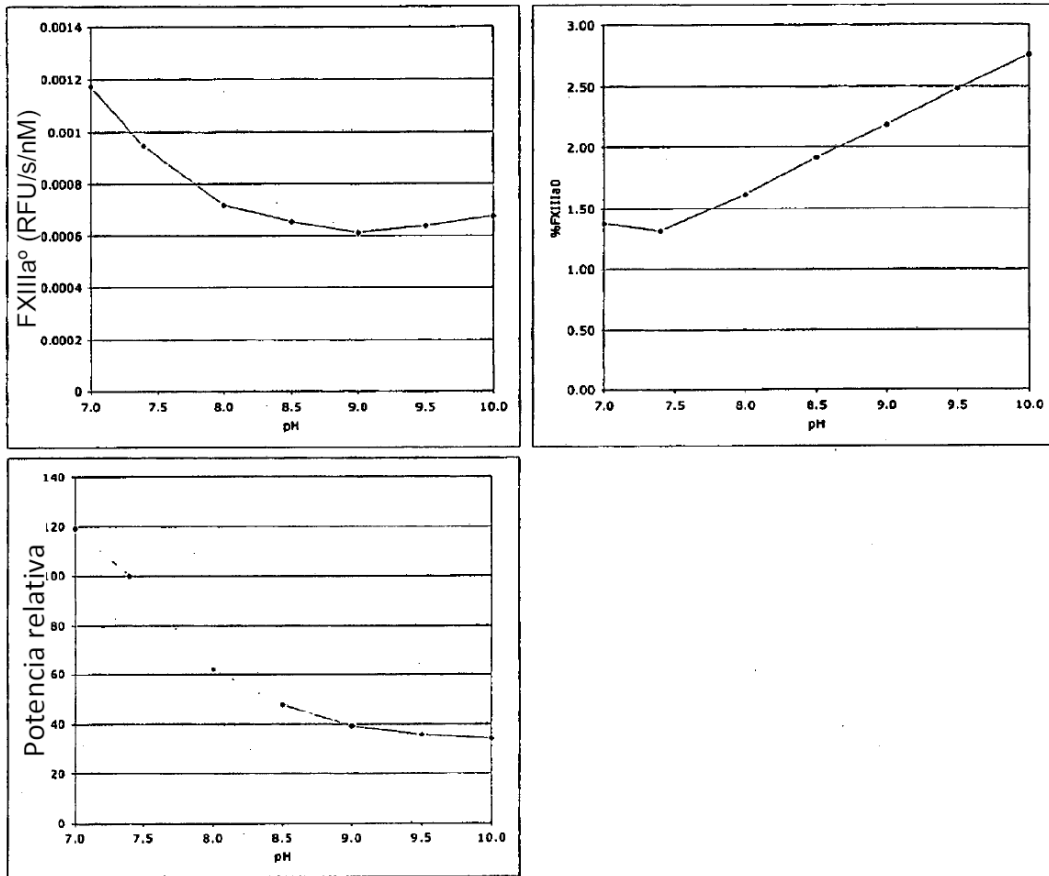


FIGURA 3

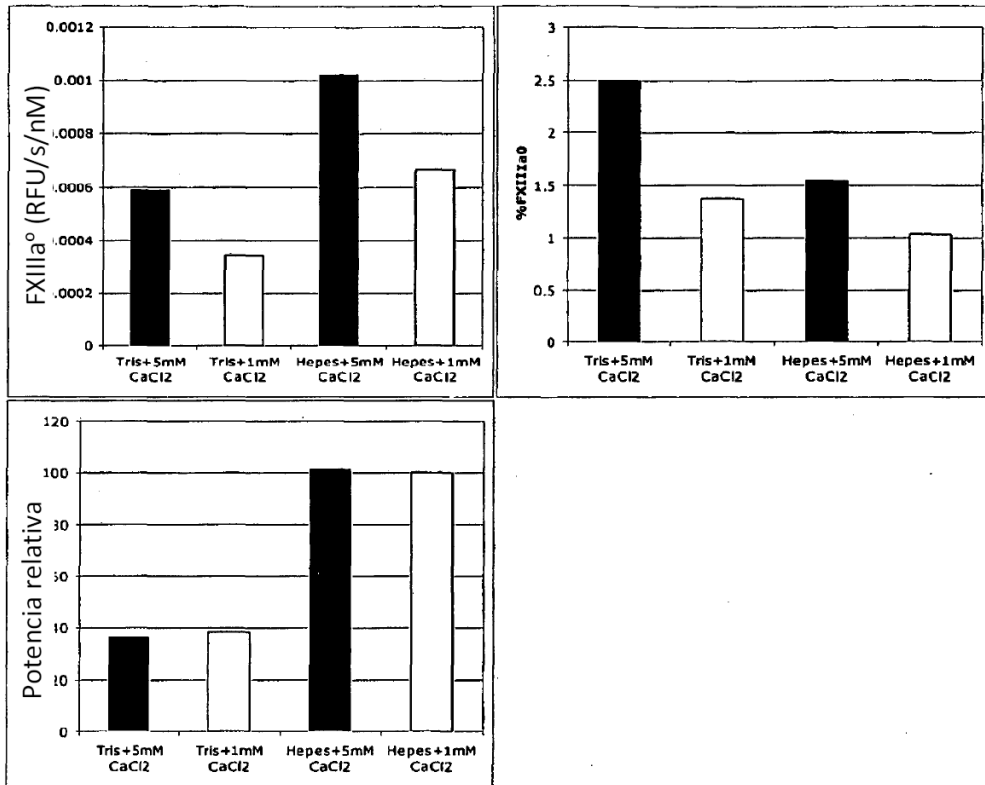
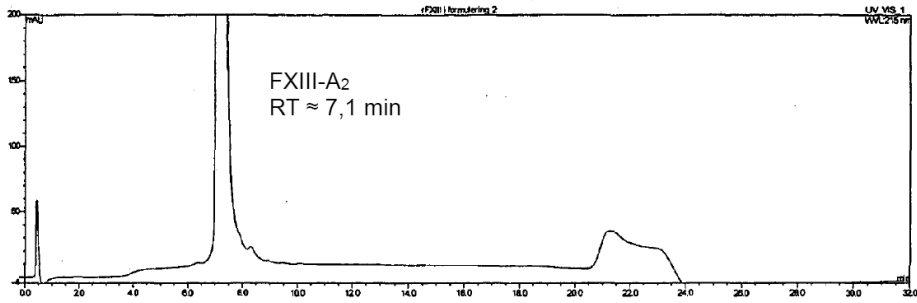


Figura 4

A



B

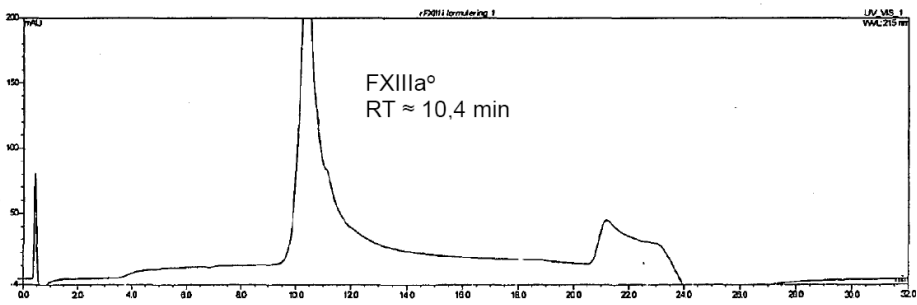


FIGURA 5

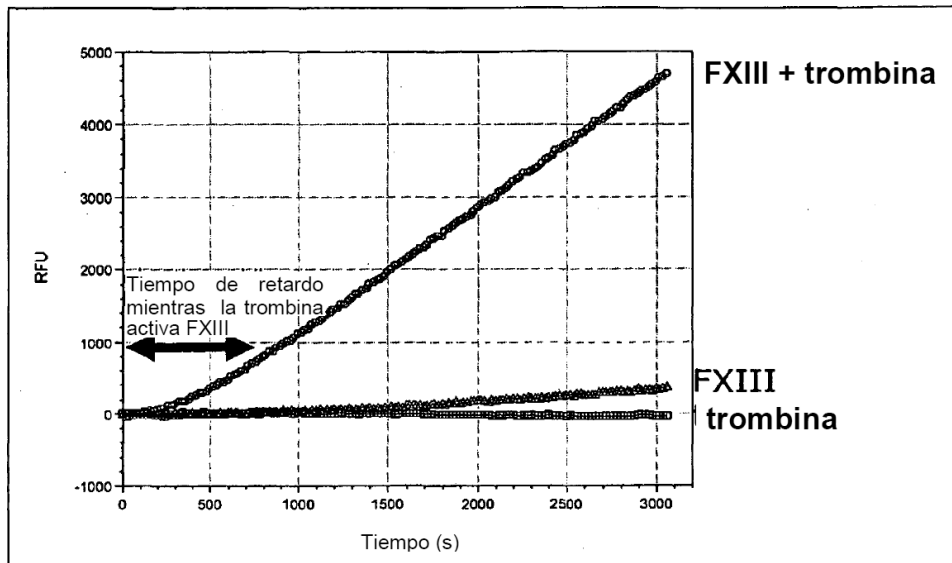


FIGURA 6