

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 778**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2013** **E 13156498 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2637025**

54 Título: **Procedimiento de detección para hallar muestras con una alteración en la funcionalidad de la interacción GPIb-factor de von Willebrand**

30 Prioridad:

**05.03.2012 EP 12158022**

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

**01.07.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PATZKE, JUERGEN, DR.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 575 778 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

Procedimiento de detección para hallar muestras con una alteración en la funcionalidad de la interacción GPIb-factor de von Willebrand.

5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico en coagulación y se refiere a un procedimiento de detección para la determinación de una interacción de factor de von Willebrand (VWF) y/o GPIb alterada en una muestra.

10 El factor de von Willebrand (VWF) es una glucoproteína multimérica de alto peso molecular en el plasma sanguíneo que tiene funciones importantes en el proceso de la hemostasia primaria. El VWF dispone, entre otras cosas, de sitios de unión para colágeno y para la glucoproteína Ib (GPIb), que está localizada en la superficie de los trombocitos. La GPIb es una proteína de membrana integral que forma con otra proteína de membrana integral, la glucoproteína IX (GPIX), el complejo receptor glucoproteína Ib-IX en la membrana de los trombocitos. La GPIb es una molécula de dos cadenas 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 $\beta$ ) que están unidas entre sí a través de enlaces disulfuro (Lopez, J. A. *et al.*, 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 1987, 84: 5615-5619). La glucocalicina es un fragmento de la cadena GPIb $\alpha$  que se escinde proteolíticamente del receptor intacto de la membrana de los trombocitos. La glucocalicina se puede detectar en plasma. Concentraciones aumentadas de glucocalicina libre en el plasma indican una alteración de la función plaquetaria (Beer, J. H. *et al.*, Glycocalicin: A New Assay - The Normal Plasma Levels And Its Potential Usefulness in Selected Diseases. Blood 1994, 83(3): 691-702).

25 En el caso de una lesión vascular se dejan expuestas superficies de colágeno a las que se une el VWF. Como consecuencia de la unión a colágeno y bajo la influencia de las mayores fuerzas de cizalla que actúan sobre el VWF unido a colágeno, el VWF cambia o se activa de tal manera que puede unirse al extremo aminoterminal de la cadena pesada de la GPIb (GPIb $\alpha$ ) en el complejo receptor GPIb-IX de la membrana de los trombocitos. De este modo, el VWF activado capta los trombocitos que fluyen a su lado, de tal manera que en el lugar de la lesión se forma un primer aglomerado de VWF, colágeno y trombocitos. Después se activan los trombocitos y, con ello, también se inicia la coagulación plasmática que finalmente conduce, después de varias cascadas de amplificación y la deposición de más trombocitos, al cierre de la herida. Las alteraciones de la interacción VWF-GPIb conducen a una mayor tendencia a hemorragias.

35 Las alteraciones cualitativas o cuantitativas del VWF son la causa de un denominado Síndrome de von Willebrand (sinónimo: *von Willebrand Disease*, VWD), uno de los trastornos de la coagulación hereditarios más frecuentes. Para el diagnóstico de un síndrome de von Willebrand están disponibles distintos procedimientos de detección tales como, por ejemplo, la determinación del tiempo de sangrado (TS), procedimientos cuantitativos para la determinación de la concentración de antígeno de VWF (VWF:Ag), tales como, por ejemplo procedimientos ELISA así como procedimientos para la determinación de la actividad de VWF tales como, por ejemplo, la aglutinación de plaquetas inducida por ristocetina (VWF:RCo).

En la última generación de ensayos funcionales para la determinación de la actividad de VWF se determina la capacidad de unión a GPIb $\alpha$  del VWF.

40 Se conocen ensayos en los que se usa GPIb $\alpha$  de tipo natural y se determina la unión del VWF a GPIb $\alpha$  en presencia de ristocetina (documento WO 01/02853 A2; Vanhoorelbeke, K. *et al.*, A reliable von Willebrand factor: Ristocetin cofactor enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between type 1 and type 2 von Willebrand disease. Semin Thromb Hemost. 2002, 28(2): 161-165; Federici, A. B. *et al.*, A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Iba for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. Haematologica 2004, 89(1): 77-85).

Son conocidos otros ensayos en los que se usan las denominadas mutaciones de ganancia de función de GPIb $\alpha$  que, como es sabido, presentan una mayor afinidad por VWF e interaccionan más intensamente con VWF que la proteína GPIb $\alpha$  de tipo natural. En estos ensayos se puede determinar la unión del VWF a la GPIb $\alpha$  mutada en ausencia de ristocetina (documento WO 2009/007051 A2 o documento WO 2009/026551 A1).

50 Los defectos de la proteína GPIb causan asimismo trastornos de la coagulación. Las mutaciones de ganancia de función de la proteína GPIb son la causa del síndrome de von Willebrand de tipo plaquetario (PT-VWD), un trastorno hereditario de la coagulación autosómico dominante. La sustitución del resto metionina en la posición 239 de la cadena GPIb $\alpha$  por un resto valina (M239V) se describió por Russell y Roth (Russell, S. D. y Roth, G. J., Pseudo-von Willebrand Disease: A mutation in the platelet glycoprotein Iba gene associated with a hyperactive surface receptor. Blood 1993, 81(7): 1787-1791). También las mutaciones en la posición 233 de la cadena de GPIb $\alpha$  pueden causar

una PT-VWD (Matsubara, Y. *et al.*, Identification of a novel point mutation in platelet glycoprotein Iba, Gly to Ser at residue 233, in a Japanese family with platelet-type von Willebrand disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003, 1: 2198-2205).

5 Si en un paciente se diagnostica una mayor tendencia a hemorragias, es necesario detectar la causa de la alteración para poder iniciar una terapia adecuada. A causa de las muchas posibles alteraciones que pueden causar una mayor tendencia a hemorragias, en el diagnóstico clínico es deseable disponer de ensayos de detección que  
 10 de detección no se comprueba ninguna alteración en una determinada subzona, entonces se puede prescindir de la realización de ensayos individuales específicos.

Por tanto, la presente invención se basaba en el objetivo de facilitar un procedimiento de detección que posibilite comprobar alteraciones de la interacción VWF-GPIb. Un procedimiento de este tipo debía ser igualmente sensible para alteraciones del VWF como para alteraciones de la proteína GPIb.

15 Las alteraciones en la interacción VWF-GPIb pueden ser causadas, por ejemplo, por

- a) alteraciones cuantitativas o cualitativas de la proteína VWF, tales como, por ejemplo, estados carenciales anormales, ausencia de los grandes multímeros, ausencia de capacidad de unión a factor VIII;
- b) inhibidores de VWF tales como, por ejemplo, autoanticuerpos contra el VWF, que evitan la unión del VWF a GPIb o concentraciones aumentadas de glucocalicina en el plasma, que ocupa los sitios de unión de VWF y, por tanto,  
 20 reduce la actividad de VWF o agentes terapéuticos inhibidores de VWF tales como, por ejemplo, ARC1779, un aptámero de unión a VWF o AJW200, un anticuerpo anti-VWF monoclonal humanizado (Firbas, C. *et al.*, Targeting von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib receptor. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2010, 8(12): 1689-1701) o fragmento de GPIb que se emplea como agente terapéutico (Hennan, J. K. *et al.*, Pharmacologic inhibition of platelet VWF-GPIba interaction prevents coronary artery thrombosis. *Thromb Haemost* 2006, 95: 469-75);
- 25 c) activadores de VWF;
- d) alteraciones cualitativas de la proteína GPIb tales como, por ejemplo, mutaciones de ganancia de función que presentan una mayor afinidad por VWF y aceleran, por lo tanto, la degradación de VWF;
- e) inhibidores de GPIb tales como, por ejemplo, autoanticuerpos contra GPIb que evitan la unión del VWF a GPIb o agentes terapéuticos tales como, por ejemplo, H6B4-Fab, el fragmento Fab de un anticuerpo anti-GPIba monoclonal  
 30 humanizado (véase asimismo Firbas, C. *et al.*);
- f) activadores de GPIb (por ejemplo, trombina).

35 El objetivo se resuelve al ponerse en contacto la muestra de un paciente con proteína GPIba aislada, con proteína VWF y con una fase sólida que está asociada a un anticuerpo específico de GPIba y al determinarse la formación de complejo entre proteína VWF, proteína GPIba y la fase sólida. Si la formación de complejo está disminuida o aumentada con respecto a la normal, entonces existe una alteración de la interacción VWF-GPIb. Tales muestras se deberían examinar entonces con ayuda de ensayos individuales específicos de forma dirigida en cuanto a alteraciones de VWF o GPIb.

Por tanto, el objeto de la presente invención es un procedimiento para hallar una muestra con una interacción VWF-GPIb alterada, en el que

- 40 a. la muestra se pone en contacto con proteína GPIba, con proteína VWF y con una fase sólida que está asociada a un anticuerpo con especificidad para la proteína GPIba aislada y
- b. se determina la formación de complejo entre proteína VWF, proteína GPIba y la fase sólida.

El procedimiento detecta alteraciones de la interacción VWF-GPIb en el lado tanto de VWF como de GPIb.

45 El término "muestra" comprende líquidos biológicos, en particular de seres humanos y animales, tales como sangre, plasma o suero.

50 En el caso de la proteína GPIba usada en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede tratar de una proteína GPIba producida de forma recombinante o sintética. Para la producción de proteína GPIba recombinante son adecuados sistemas de expresión procariotas o eucariotas conocidos, tales como, por ejemplo, la expresión en bacterias (por ejemplo, *E. coli*), en levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), en cultivos de células vegetales, animales o humanas. Para la producción de proteína GPIba sintética son adecuadas técnicas conocidas para la síntesis de proteínas *in vitro* tales como, por ejemplo síntesis en fase sólida (por ejemplo, síntesis de Merrifield). Preferentemente, en el caso de la proteína GPIba usada en el procedimiento de acuerdo con la invención se trata de proteína GPIba producida de forma recombinante que se ha producido en un cultivo de células humanas, preferentemente en un cultivo de células de riñón embrionarias humanas (células HEK).

Preferentemente se añade la proteína GPIIb $\alpha$  a la preparación de ensayo en tal cantidad que se obtiene una concentración final de menos de 1,4  $\mu$ g/ml de GPIIb $\alpha$  en la preparación de ensayo, de forma particularmente preferente de menos de 0,7  $\mu$ g/ml de GPIIb $\alpha$  en la preparación de ensayo.

5 La proteína GPIIb $\alpha$  usada en el procedimiento de acuerdo con la invención puede estar fusionada en el extremo N con la secuencia señal de GPIIb $\alpha$  humana homóloga MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO: 2, denominada también restos de aminoácidos -16 a -1). Como alternativa, la proteína GPIIb $\alpha$  usada puede estar fusionada en el extremo N con una secuencia señal heteróloga, es decir, con un polipéptido que habitualmente no está presente en el polipéptido GPIIb $\alpha$  humano que, no obstante, en el sistema de expresión seleccionado influye positivamente en la expresión y/o secreción de la proteína GPIIb $\alpha$  expresada de forma recombinante. Una secuencia señal heteróloga  
10 adecuada es, por ejemplo, MPLQLLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRR (SEQ ID NO: 3).

Además, la proteína GPIIb $\alpha$  usada en el procedimiento de acuerdo con la invención puede estar fusionada en el extremo C con uno o varios marcadores de afinidad que posibilitan la unión de la proteína expresada, por ejemplo, de forma recombinante, a un soporte de afinidad, por lo que se posibilita, por ejemplo, la purificación de proteína GPIIb $\alpha$  expresada de forma recombinante. Se prefieren pequeños marcadores de afinidad con una longitud de no  
15 más de 12 aminoácidos. Se prefieren en particular marcadores de afinidad del grupo marcador His, marcador Flag, marcador Arg, marcador c-myc y marcador Strep. Son soportes de afinidad adecuados que se unen con elevada afinidad a un marcador de afinidad, por ejemplo, anticuerpos específicos, cationes inmovilizados (por ejemplo Ni<sup>2+</sup> con afinidad por marcadores His) u otros tipos de compañeros de unión (por ejemplo, estreptavidina con afinidad por marcadores Strep).

20 En una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la proteína GPIIb $\alpha$  aislada es proteína GPIIb $\alpha$  de tipo natural humana (SEQ ID NO: 1) o un fragmento funcional de la misma. Si se usa una proteína GPIIb $\alpha$  de tipo natural humana o un fragmento funcional de la misma, se añade a la preparación de ensayo además ristocetina, botrocetina o una sustancia equivalente a ristocetina para que se induzca *in vitro* una unión de VWF disuelto a la proteína GPIIb $\alpha$  de tipo natural o a fragmentos de la misma.

25 En otra forma de realización, la proteína GPIIb $\alpha$  aislada está mutada y contiene, en comparación con la secuencia de tipo natural de la proteína GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO: 1), al menos los restos de aminoácidos 1-268 y en al menos dos de las posiciones 233, 235 y 239, en cada caso, una sustitución Xaa. Preferentemente, las sustituciones Xaa de resto glicina en la posición 233 y del resto metionina en la posición 239 de la cadena GPIIb $\alpha$  están compuestas de un resto valina (G233V o M239V) o un resto serina (G233S o M239S). Es posible cualquier combinación de las  
30 diferentes sustituciones Xaa en las dos posiciones. Se prefiere en particular la combinación G233V/M239V. La sustitución Xaa del resto ácido aspártico en la posición 235 está compuesta, preferentemente, de un resto tirosina (D235Y). En el caso de las mutaciones mencionadas se trata de mutaciones de ganancia de función que presentan una afinidad significativamente mayor por VWF y que interactúan más intensamente con VWF que la proteína GPIIb $\alpha$  de tipo natural. Si se usa tal mutación, no se añade a la preparación de ensayo ristocetina, botrocetina ni una  
35 sustancia equivalente a ristocetina.

En el caso de la proteína VWF usada el procedimiento de acuerdo con la invención se puede tratar de VWF multimérico de alto peso molecular aislado. El monómero de VWF humano se sintetiza *in vivo* en primer lugar como una proteína precursora de 2813 aminoácidos de longitud. Gracias al procesamiento intracelular se producen  
40 multímeros de VWF que pueden tener un tamaño de más de 20 000 kDa. Estos multímeros están compuestos de monómeros de VWF dispuestos de forma lineal, unidos entre sí a través de enlaces disulfuro, de 275 kDa de tamaño, de 2050 aminoácidos de longitud. En el plasma, el VWF circula en forma globular de multímeros de diferente tamaño de aproximadamente 500 kDa (dímero) a más de 15 000 kDa de tamaño. La proteína VWF aislada usada en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede obtener de plasmas de donantes o se puede expresar de forma recombinante con ayuda de procedimientos conocidos por el experto. Como alternativa, la  
45 proteína VWF se puede añadir también en forma natural, por ejemplo, en forma de un plasma normal a la preparación de ensayo.

Preferentemente se añade la proteína VWF a la preparación de ensayo en tal cantidad que se obtiene una concentración final del 0,1-20 % de la norma del VWF en la preparación de ensayo, de forma particularmente preferente del 0,5-10 % de la norma en la preparación de ensayo.

50 En el caso del anticuerpo usado en el procedimiento de acuerdo con la invención con especificidad por la proteína GPIIb $\alpha$  aislada se puede tratar de cualquier anticuerpo que reconozca específicamente la proteína GPIIb $\alpha$  usada en la preparación de ensayo. Básicamente son adecuados anticuerpos de GPIIb $\alpha$  que se unen a un epítipo de la proteína GPIIb $\alpha$ . Siempre que se use una proteína GPIIb $\alpha$  recombinante y fusionada con un marcador de afinidad, es adecuado también un anticuerpo específico de marcador de afinidad que se une específicamente al marcador de  
55 afinidad. El término anticuerpo comprende también fragmentos de anticuerpo que disponen de la misma especificidad por antígeno que el anticuerpo completo.

El anticuerpo está asociado a una fase sólida. El término "asociado" se ha de entender de forma amplia y

comprende, por ejemplo, una unión covalente y una no covalente, una unión directa y una indirecta, la adsorción a una superficie y la inclusión en una cavidad. En el caso de una unión covalente, el anticuerpo está unido a la fase sólida a través de un enlace químico. Un ejemplo de una unión no covalente es la adsorción superficial. Aparte de una unión directa a la fase sólida, el anticuerpo puede estar unido también indirectamente a través de interacción específica con otros compañeros de unión específicos a la fase sólida, por ejemplo, a través de interacción específica con otro anticuerpo.

En el sentido de la presente invención, la expresión "fase sólida" incluye un objeto que está compuesto de material poroso y/o no poroso, insoluble en agua y que puede presentar las más diversas formas tales como, por ejemplo, recipiente, tubos, placa de microtitulación (placa ELISA), bola, micropartícula, varilla, tira, papel de filtro o de cromatografía, etc. Por norma general, la superficie de la fase sólida es hidrófila o se puede convertir en hidrófila. 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 de origen natural modificados. Son ejemplos de materiales de fase sólida polímeros tales como, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, polivinilcloruro, poliacrilamida, moléculas de dextrano reticuladas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nylon; látex; cerámica; vidrio; metales, en particular metales nobles tales como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de los mismos.

La fase sólida puede presentar un revestimiento de una o varias capas, por ejemplo, de proteínas, hidratos de carbono, sustancias lipófilas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de los mismos para reprimir o para evitar, por ejemplo, la unión inespecífica de constituyentes de la muestra a la fase sólida o para, por ejemplo, conseguir mejoras en relación con la estabilidad de la suspensión de fases sólidas en partículas, de la estabilidad en almacenamiento, de la estabilidad de conformación o la resistencia contra luz UV, microbios u otros agentes de efecto destructor.

Mediante la puesta en contacto de la proteína GPIIb $\alpha$  aislada con proteína VWF y con una fase sólida, que está asociada a un anticuerpo con especificidad por la proteína GPIIb $\alpha$  aislada, se forma un complejo de los tres componentes. Si en la muestra del paciente están contenidas sustancias que influyen en esta formación del complejo, por ejemplo, inhibidores o activadores de GPIIb o VWF o glucocalicina o si la muestra contiene proteínas GPIIb o VWF alteradas funcionalmente que concurren con las proteínas añadidas funcionales durante la formación del complejo, se mide una formación de complejo modificada con respecto a la normal.

En una forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención, el anticuerpo con especificidad por la proteína GPIIb $\alpha$  aislada está asociada a una fase sólida en partículas, preferentemente a partículas de látex. La formación de complejo entre la proteína VWF, proteína GPIIb $\alpha$  y la fase sólida se puede determinar entonces mediante medición de la aglutinación de la fase sólida en partículas. Para la determinación cuantitativa de la reacción de aglutinación que se correlaciona con la formación de complejo y, por tanto, con la actividad de GPIIb y VWF existente en la muestra, por ejemplo, se puede aprovechar la dispersión de luz en los agregados de partículas a través de la medición de la intensidad de luz de dispersión (nefelometría) o a través de la medición de la opacidad del medio (turbidimetría).

En otra forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el anticuerpo con especificidad por la proteína GPIIb $\alpha$  aislada está asociado a una fase sólida no en partículas, preferentemente a la superficie de una placa de microtitulación. La formación del complejo entre proteína VWF, proteína GPIIb $\alpha$  y la fase sólida se puede determinar entonces mediante medición de la cantidad de VWF que se une a través del complejo a la fase sólida. Para la determinación de la cantidad de VWF que se ha unido a la fase sólida a través del complejo se puede usar, por ejemplo, un anticuerpo anti-VWF que está directa o indirectamente asociado a un componente de un sistema formador de señal y que permite, por lo tanto, la cuantificación de la cantidad de VWF unido.

Otro objeto de la presente invención es un kit de ensayo para la realización de un procedimiento de acuerdo con la invención que contiene un primer reactivo que contiene proteína GPIIb $\alpha$  aislada, un segundo reactivo que contiene proteína VWF y un tercer reactivo que contiene una fase sólida, preferentemente una fase sólida en partículas, que está asociada a un anticuerpo con especificidad por la proteína GPIIb $\alpha$  aislada.

En una forma de realización, el primer reactivo contiene proteína GPIIb $\alpha$  de tipo natural humana o un fragmento funcional de la misma. En otra forma de realización, el primer reactivo contiene una proteína GPIIb $\alpha$  mutada que, en comparación con la secuencia de tipo natural de la proteína GPIIb $\alpha$  humana (SEQ ID NO: 1), contiene al menos los restos de aminoácidos 1-268 y en al menos dos de las posiciones 233, 235 y 239 presenta, en cada caso, una sustitución Xaa.

Además, el kit de ensayo puede contener un cuarto reactivo que contiene ristocetina o botrocetina.

Además, el kit de ensayo puede contener un quinto reactivo que contiene un anticuerpo anti-VWF.

Los reactivos se pueden facilitar en forma líquida o liofilizada. En el caso de que esté presente un reactivo como liofilizado, el kit de ensayo puede contener adicionalmente un disolvente requerido para la suspensión del liofilizado tal como, por ejemplo, agua destilada o un tampón adecuado.

5 En otra forma de realización, para una mejor estandarización de los resultados se puede llevar a cabo una normalización. Para esto se divide el resultado de la muestra por el resultado de un plasma normal. De este modo, una interacción VWF-GPIIb particularmente intensa se manifiesta por un índice mayor de 1 y una interacción VWF-GPIIb reducida, por un índice menor de 1. Además se puede llevar a cabo también una calibración con un calibrador. Este calibrador contiene factor de von Willebrand. Sin embargo, los resultados se deben expresar en unidades artificiales, ya que en la muestra se detecta la interacción GPIIb-VWF. Un inhibidor frente a GPIIb reduce los resultados del ensayo, a pesar de que permanece normal la actividad de VWF.

15 Si con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención se identifica una muestra con una interacción VWF-GPIIb alterada, se deben llevar a cabo ensayos posteriores para la delimitación más detallada de la alteración. En este caso se puede llevar a cabo una variante del procedimiento de acuerdo con la invención en la que se añaden la GPIIb $\alpha$  o el VWF o ambos a la preparación de ensayo en un gran exceso. Si se añade en un gran exceso GPIIb $\alpha$ , entonces el ensayo ya solo reacciona a alteraciones de la actividad de VWF. Si se añade en un gran exceso VWF, entonces el ensayo ya solo reacciona a alteraciones en el lado de GPIIb de la interacción. Si se añaden en un gran exceso GPIIb $\alpha$  y VWF, se podrían detectar, por ejemplo, autoanticuerpos contra el anticuerpo de captura unido a fase sólida que impiden la unión de la GPIIb $\alpha$ .

20 Una posible alteración en el lado de GPIIb es un aumento o una reducción de la concentración de glucocalicina en la muestra. En presencia de un gran exceso de VWF y cuando se pueden descartar otras alteraciones, se puede emplear el procedimiento también para la determinación del contenido de glucocalicina de la muestra (Figura 2), siendo necesaria una calibración con un patrón de glucocalicina. Un gran exceso de VWF se puede conseguir, por ejemplo, mediante la adición de 20  $\mu$ l de un reactivo con el 1000 o 2000 % de actividad de VWF, de tal manera que está presente una actividad de VWF del 99 % o del 197 % de la norma en la preparación de ensayo. Un gran exceso de GPIIb $\alpha$  se puede conseguir, por ejemplo, mediante la adición de 13  $\mu$ l de un reactivo con 35  $\mu$ g/ml de proteína GPIIb $\alpha$ , de tal manera que está presente una concentración de 2,2  $\mu$ g/ml de proteína GPIIb $\alpha$  en la preparación de ensayo.

30 Por tanto, otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la determinación de la concentración de glucocalicina en una muestra, poniéndose en contacto la muestra con proteína GPIIb $\alpha$  aislada, con proteína VWF y con una fase sólida que está asociada a un anticuerpo con especificidad por la proteína GPIIb $\alpha$  aislada y determinándose la formación de complejo entre proteína VWF, proteína GPIIb $\alpha$  y la fase sólida. Para la determinación de la concentración de glucocalicina es necesario que se añada a la preparación de ensayo una cantidad de proteína VWF, de tal manera que se obtenga una actividad de VWF de al menos el 50 %, preferentemente de más del 100 % de la norma en la preparación de ensayo. Preferentemente se lleva a cabo una calibración con calibradores que contienen diferentes concentraciones de glucocalicina.

Descripción de las figuras

Figura 1

La Figura 1 muestra que un ensayo de aglutinación de partículas de látex basado en el procedimiento de acuerdo con la invención es sensible para distintas actividades de VWF.

40 Figura 2

La Figura 2 muestra que un ensayo de aglutinación de partículas de látex basado en el procedimiento de acuerdo con la invención es sensible para diferentes concentraciones de glucocalicina.

Figura 3

45 La Figura 3 muestra que un ensayo de aglutinación de partículas de látex basado en el procedimiento de acuerdo con la invención no es sensible para distintas actividades de VWF cuando se añade un exceso de VWF a la preparación de ensayo.

## Ejemplos

**Ejemplo 1** procedimiento de detección de acuerdo con la invención para hallar muestras con una interacción VWF-GPIIb alterada

50

5 Como muestra se usó plasma citrado humano de 6 donantes distintos. Se mezclaron 60 µl de muestra con 20 µl de un plasma que contenía VWF (91 % de la norma de VWF, Kontroll Plasma N, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania), 13 µl de una solución que contenía un fragmento de proteína GPIIb con ganancia de función recombinante (aminoácidos 1-285 con sustituciones de aminoácidos G233V y M239V; 8,4 µg/ml) y 70 µl de un tampón NaCl y se incubaron durante 2 minutos. A continuación se añadieron a la preparación de ensayo 40 µl de un reactivo de partículas de látex que contenía partículas de látex que estaban revestidas con anticuerpos contra GPIIb.

10 La extinción de la mezcla de reacción se registró a 570 nm mediante turbidimetría. Debido a la unión de VWF a la GPIIb y la unión de la proteína GPIIb a las partículas de látex se produce la aglutinación de las partículas. Esta aglutinación conduce a un aumento de la extinción, cuya velocidad máxima se establece (mE/min).

Como se representa en la Figura 1, el procedimiento es sensible para diferentes actividades de VWF. La velocidad de aglutinación es mayor cuanto mayor sea la actividad de VWF en una muestra de plasma.

15 En otro ensayo, en lugar de plasma de donante se usaron como muestra distintas diluciones de una solución de glucocalicina (0, 1,2, 2,5 y 5 µg/ml de glucocalicina). La solución de glucocalicina se preparó mediante un tratamiento con plasma de trombocitos lavados.

Como está representado en la Figura 2, el procedimiento es sensible para diferentes concentraciones de glucocalicina. La velocidad de aglutinación es mayor cuanto menor sea la concentración de glucocalicina en una muestra.

20 En otro ensayo, en lugar de plasmas de donante se usó plasma combinado normal (Kontrollplasma N) que se enriqueció con distintas cantidades de un anticuerpo anti-GPIIb que inhibe la unión de GPIIb a VWF (anticuerpo AK2; véase Hayata, K. *et al.*, A new binding assay of von Willebrand factor and glycoprotein Ib using solid-phase biotinylated platelets. J Pharmacol Sci 2008, 108: 217-221). Además se midió el plasma citrado de un donante con una actividad de VWF ligeramente menor. En la Tabla 1 están resumidos los resultados. Por consiguiente, el procedimiento es sensible para factores que inhiben la unión VWF-GPIIb. La velocidad de aglutinación es menor  
25 cuanto más inhibidor esté contenido en una muestra.

**Tabla 1**

Muestra	Velocidad de aglutinación (mE/min)
Plasma combinado normal	633
Plasma combinado normal + 10 µg/ml de anticuerpo AK2	266
Plasma combinado normal + 20 µg/ml de anticuerpo AK2	133
Plasma con actividad de VWF ligeramente reducida (63,1 %)	348

**Ejemplo 2: Modificación, adecuada como ensayo posterior, del procedimiento de detección de acuerdo con la invención**

30 Como en el Ejemplo 1 se usó como muestra plasma citrado normal de 5 donantes distintos. En el lugar del plasma normal que contenía VWF (91 % de la norma de VWF) se añadieron, sin embargo, a la preparación de ensayo 20 µl de un plasma que gracias a la adición de un concentrado de VWF (Hämate, CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania) presentaba una actividad de VWF del 2000 % de la norma.

35 Como está representado en la Figura 3, el procedimiento debido a la presencia de un gran exceso de VWF ya no es sensible para distintas actividades de VWF en las muestras de donante. Un procedimiento de este tipo ya solo es sensible para alteraciones de la interacción VWF-GPIIb que se encuentran en el lado de GPIIb.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
- <120> Procedimiento de detección para hallar muestras con una alteración en la funcionalidad de la interacción GPIIb-factor de von Willebrand
- 45 <130> 2011P27081EP01
- <150> EP 12158022.9
- <151> 05-03-2012

ES 2 575 778 T3

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <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
  
```

ES 2 575 778 T3

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

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

ES 2 575 778 T3

Ala Thr Ser Pro Thr Ile Leu Val Ser Ala Thr Ser Leu Ile Thr Pro  
 420 425 430

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  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

5

10

ES 2 575 778 T3

<210> 3  
<211> 41  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> péptido señal heterólogo

10

<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. Procedimiento para hallar una muestra de paciente con una interacción VWF-GPIb alterada, en el que
  - a. se pone en contacto una muestra de sangre, plasma o suero de un paciente con proteína GPIb $\alpha$  aislada, con proteína VWF y con una fase sólida que está asociada a un anticuerpo con especificidad por la proteína GPIb $\alpha$  aislada y
  - b. se determina la formación de complejo entre proteína VWF, proteína GPIb $\alpha$  y la fase sólida.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, siendo la proteína GPIb $\alpha$  una proteína GPIb $\alpha$  de tipo natural humana o un fragmento funcional de la misma y poniéndose en contacto la muestra, adicionalmente, con ristocetina o botrocetina.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, estando mutada la proteína GPIb $\alpha$  y conteniendo, en comparación con la secuencia de tipo natural de la proteína GPIb $\alpha$  humana, al menos los restos de aminoácidos 1-268 y presentando, en al menos dos de las posiciones 233, 235 y 239, en cada caso una sustitución Xaa (SEQ ID NO: 1) y no poniéndose en contacto la muestra con ristocetina o botrocetina.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, presentando la proteína GPIb $\alpha$  mutada una sustitución del grupo G233V, G233S, D235Y, M239V y M239S.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, poniéndose la muestra en contacto con una cantidad de proteína GPIb $\alpha$ , de tal forma que en la preparación de ensayo en la que se determina la formación de complejo se obtiene una concentración final de menos de 1,4  $\mu\text{g/ml}$  de proteína GPIb $\alpha$ , de forma particularmente preferente de menos de 0,7  $\mu\text{g/ml}$  de proteína GPIb $\alpha$ .
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, poniéndose en contacto la muestra con una cantidad de proteína VWF, de tal manera que en la preparación de ensayo en la que se determina la formación de complejo se obtiene una concentración final del 0,1-20 % de la norma de la actividad de VWF, de forma particularmente preferente del 0,5-10 % de la norma de la actividad de VWF.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, siendo la fase sólida una fase sólida en partículas.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, determinándose la formación de complejo entre proteína VWF, proteína GPIb $\alpha$  y la fase sólida mediante la aglutinación de la fase sólida en partículas.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, no siendo la fase sólida una fase sólida en partículas, siendo preferentemente la superficie de una placa de microtitulación.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, determinándose la formación de complejo entre proteína VWF, proteína GPIb $\alpha$  y la fase sólida mediante la determinación de proteína VWF unida a fase sólida.

FIG 1

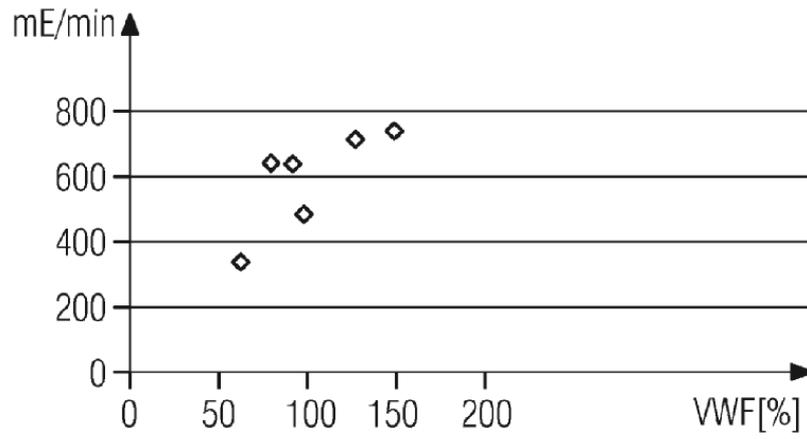


FIG 2

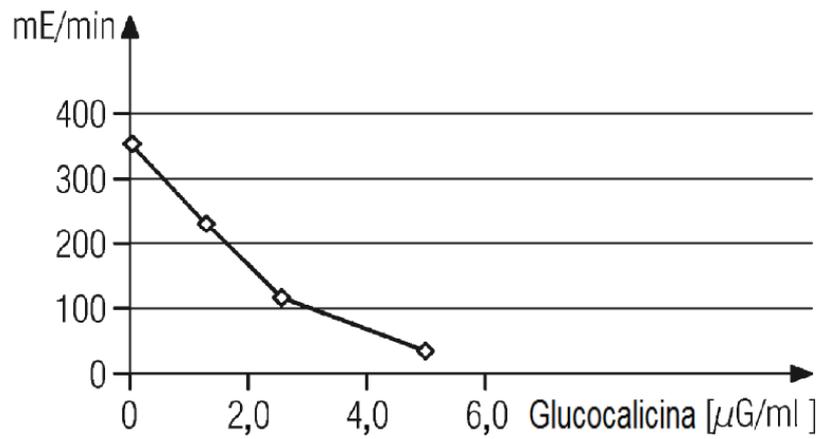


FIG 3

