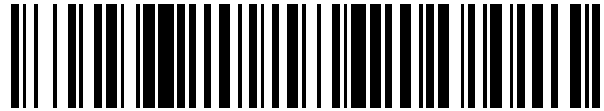


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 352**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014** **E 14158716 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2919013**

54 Título: **Método para la detección de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PATZKE, JUERGEN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 614 352 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 la detección de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina

La presente invención está en el ámbito del diagnóstico de la coagulación y se refiere a un método para la detección de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina en una muestra.

5 La trombina (Factor IIa) está involucrada en una multiplicidad de mecanismos de activación e inhibición de la coagulación de la sangre plasmática y con ello es la enzima central de la hemostasis secundaria, que comprende en primera línea la formación de fibrina. Menos bien investigado y entendido es el papel de trombina en la hemostasis primaria, que comprende la activación de las plaquetas y adhesión de las plaquetas debida a una lesión del endotelio. Se sabe que la trombina es un activador de plaquetas y que estimula la agregación de plaquetas. Los
10 receptores de trombina más importantes sobre la superficie de las plaquetas son por un lado los receptores PAR (receptores activados por proteasa) y por otro lado el complejo receptor de glicoproteína Ib-V-IX. El complejo receptor de glicoproteína Ib-V-IX comprende la proteína integral de membrana de glicoproteína Ib (GPIIb), la proteína integral de membrana de glicoproteína IX (GPIX) y glicoproteína V (De Candia, E., Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. Thrombosis Research 2012, 129: 250-256).

15 La GPIIb es una molécula de dos cadenas, que consiste en una cadena pesada con una masa molecular aparente de aproximadamente 145 kDa (sinónimo: cadena pesada, cadena alfa o GPIIb α) y una cadena liviana con una masa molecular aparente de aproximadamente 22 kDa (sinónimo: cadena liviana, cadena beta o GPIIb β), las cuales están unidas una a otra por puentes disulfuro (Lopez, J.A. et al., Cloning of the α chain of human platelet glycoprotein Ib: A transmembrane protein with homology to leucine-rich α 2-glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1987, 84: 5615-5619).
20

La proteína GPIIb α contiene puntos de unión para la trombina y con ello provoca la unión de trombina a la glicoproteína complejo receptor Ib-V-IX. La glicocalicina es un fragmento de la cadena GPIIb α , que es escindido de manera proteolítica desde el receptor intacto en la membrana de las plaquetas. La glicocalicina es detectable en el plasma. Elevadas concentraciones de glicocalicina libre en el plasma indican un deterioro de la función de las
25 plaquetas (Beer, J.H. et al., glyocalicin: A New Assay - The Normal Plasma Levels And Its Potential Usefulness in Selected Diseases. Blood 1994, 83(3): 691-702).

Puesto que la trombina y las plaquetas juegan un papel central en la aparición de la trombosis arterial y entre tanto se exploran y aplican inhibidores de la agregación de plaquetas para la aplicación profiláctica y terapéutica, es de gran interés la investigación focalizada de la interacción de trombina y las plaquetas.

30 Por ello es deseable disponer de métodos que hagan posible la detección de moduladores, por consiguiente inhibidores o activadores, de la interacción de plaquetas-trombina en muestras de pacientes. Tales métodos harían posible la vigilancia de terapias de inhibidor de plaquetas o también la detección de factores de molestia fisiológica, como por ejemplo auto-anticuerpos inhibidores o activadores.

La presente invención basó el objetivo en poner a disposición un método para la detección focalizada de
35 moduladores de la interacción de GPIIb-trombina en una muestra.

El objetivo se logra poniendo en contacto la muestra con proteína aislada GPIIb α y con trombina aislada, y determinando la formación de complejo entre la proteína GPIIb α y trombina, en el que la proteína GPIIb α hace mutación, y comparada con la secuencia tipo silvestre de la proteína humana GPIIb α contiene por lo menos los
40 residuos de aminoácidos 1-268 y en por lo menos una de las posiciones 233, 235, 237 y 239 exhibe una sustitución Xaa hacia O: 1).

El concepto "modulador de la interacción de GPIIb-trombina" comprende sustancias que influyen en la interacción de GPIIb-trombina. Los inhibidores de la interacción de GPIIb-trombina reducen la unión de trombina a la proteína GPIIb α . Los activadores de la interacción de GPIIb-trombina refuerzan la unión de la trombina a la proteína GPIIb α .

Si la muestra contiene un activador, se fortalece la formación de complejo respecto a una muestra normal.

45 Si la muestra contiene un inhibidor, por ejemplo

- un inhibidor de trombina administrado terapéuticamente, por ejemplo del grupo de los inhibidores-I de exositos (por ejemplo hirudina) o inhibidores-II de exositos (por ejemplo heparina) (Ruggeri, Z.M. et al., Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. Thrombosis and Haemostasis 2010, 104.5: 894-902) o

50 • un inhibidor fisiológico de trombina, como por ejemplo autoanticuerpos contra trombina, que impide la unión de trombina a GPIIb α , o

• un inhibidor de GPIIb administrado de modo terapéutico, como por ejemplo un anticuerpo anti-GPIIb β , por ejemplo el anticuerpo 4H12 (US 5486361 A) o el anticuerpo SZ2 (Ruan, C. et al., A murine antiglycoprotein Ib complex monoclonal antibody, SZ 2, inhibits platelet aggregation induced by both ristocetin and collagen. Blood 1987, 69(2): 570-577) o H6B4-Fab, el fragmento Fab de un anticuerpo anti-GPIIb 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 GPG-290, un anticuerpo quimérico recombinante, que contiene los aminoácidos 1-290 terminales en amino de GPIIb acoplados a IgG1 humano (Yeung, J. & Holinstat, M., Newer agents in antiplatelet therapy: a review. Journal of Blood Medicine 2012, 3: 33-42), o

• un inhibidor fisiológico de GPIIb, como por ejemplo autoanticuerpo contra GPIIb, que impide la unión de GPIIb a trombina, o

• concentraciones elevadas de glicocalicina, que compite con la proteína GPIIb por la unión a la trombina,

se disminuye la formación de complejo respecto a una muestra normal.

Por ello, es objetivo de la presente invención un método para la detección de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina en una muestra, en el que se pone en contacto la muestra con proteína GPIIb aislada con trombina aislada y se determina la formación de complejo entre la proteína GPIIb y trombina. La proteína GPIIb usada hace mutación y contiene, comparada con la secuencia tipo silvestre de la proteína GPIIb humana, por lo menos los residuos aminoácido 1-268 y exhibe en por lo menos una de las posiciones 233, 235, 237 y 239 una sustitución Xaa (SEQ ID NO: 1).

Es ventajoso que este método se maneja sin el uso de plaquetas de sangre. La producción de reactivos de plaquetas de sangre animal o humana es costosa y no garantiza calidad consistente.

El concepto "muestra" comprende líquidos biológicos, en particular de humanos y animales, como sangre, plasma o suero.

El concepto "muestra normal" comprende un material de referencia, que en el uso como muestra en el método de acuerdo con la invención genera un valor de medición que corresponde a la interacción de GPIIb-trombina de un individuo sano o bien una población de individuos sanos, el o los que no muestran ninguna interacción de GPIIb-trombina influenciada por un modulador de la interacción de GPIIb-trombina. Como material de referencia es adecuado por ejemplo un conjunto de un líquido corporal, por ejemplo un conjunto de plasma normal o conjunto de suero normal, de por regla general por lo menos 20 individuos evidentemente saludables.

La proteína GPIIb usada en el método de acuerdo con la invención puede ser una proteína GPIIb producida de modo recombinante o sintético. Para la producción de la proteína GPIIb recombinante son adecuados sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos conocidos, como por ejemplo la expresión en bacterias (por ejemplo E. coli), en levaduras (por ejemplo Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris), en cultivos celulares vegetales, animales o humanos. Para la producción de proteína GPIIb sintética, son adecuadas técnicas conocidas para la síntesis in vitro de proteína, como por ejemplo síntesis en fase sólida (por ejemplo síntesis de Merrifield). De manera más preferida, la proteína GPIIb usada en el método de acuerdo con la invención es una proteína GPIIb producida de modo recombinante, que fue producida en un cultivo de células humanas, preferiblemente en un cultivo de células de riñones de embriones humanos (células HEK).

De modo más preferido se añade la proteína GPIIb a la formulación de prueba en una cantidad tal que se obtiene una concentración final de 0,5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GPIIb en la formulación de prueba, de modo particular preferiblemente de 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GPIIb en la formulación de prueba, de modo muy particular preferiblemente de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GPIIb en la formulación de prueba.

La proteína GPIIb usada en el método de acuerdo con la invención puede estar fusionada en el extremo N con la secuencia de señal de GPIIb humana homóloga MPLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO: 2, también denominada como residuos de aminoácido -16 a -1). De modo alternativo la proteína GPIIb usada puede estar fusionada en el extremo N con una secuencia de señal heteróloga, es decir con un polipéptido que no está presente comúnmente en el polipéptido GPIIb humano, pero que en el sistema de expresión elegido influye positivamente en la expresión y/o secreción de la proteína GPIIb expresada de manera recombinante. Una secuencia de señal heteróloga adecuada es por ejemplo MPLQLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRR (SEQ ID NO: 3).

Además, la proteína GPIIb usada en el método de acuerdo con la invención puede estar fusionada en el extremo C con una o varias balizas de afinidad, que hacen posible la unión de la por ejemplo proteína expresada de modo recombinante, a un vehículo de afinidad, mediante lo cual se hace posible por ejemplo la purificación de proteína GPIIb expresada de modo recombinante. Se prefieren pequeñas balizas de afinidad con una longitud no mayor a 12 aminoácidos. Se prefieren particularmente las balizas de afinidad de los grupos baliza de His, baliza de Flag, baliza de Arg, baliza de c-Myc y baliza de Strep. Son vehículos de afinidad adecuados, que se unen con mayor

afinidad a una baliza de afinidad, por ejemplo anticuerpos específicos, cationes inmovilizados (por ejemplo Ni²⁺ con afinidad por la balizas His) u otros tipos de asociados de unión (por ejemplo estreptavidina con afinidad por balizas Strep).

5 La proteína GPIIb aislada usada hace mutación y contiene - comparada con la secuencia tipo silvestre de la proteína GPIIb humana (SEQ ID NO: 1)- por lo menos los residuos aminoácido 1-268 y en por lo menos una de las posiciones 233, 235, 237 y 239, contiene una sustitución Xaa. De modo más preferido, la proteína GPIIb que ha hecho mutación contiene en dos de las posiciones 233, 235, 237 y 239, en cada caso una sustitución Xaa. De modo sorprendente se encontró que el uso de proteína GPIIb típica silvestre no es adecuado para la detección de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina.

10 De manera preferida, las sustituciones Xaa de residuo de glicina en la posición 233 y del residuo de metionina en la posición 239 de la cadena GPIIb consisten en un residuo valina (G233V o bien M239V) o un residuo serina (G233S o bien M239S). Es posible cualquier combinación de las diferentes sustituciones Xaa en ambas posiciones. Se prefiere de modo particular la combinación G233V/M239V. La sustitución Xaa del residuo ácido asparágico en la posición 235 consiste preferiblemente en un residuo tirosina (D235Y). La sustitución Xaa del residuo lisina en la posición 237 consiste preferiblemente en un residuo valina (K237V). Las mutaciones mencionadas son mutaciones de ganancia en función, que exhiben de manera notoria una afinidad significativamente más alta hacia VWF e interactúan más fuertemente con VWF que la proteína GPIIb silvestre típica. A la formulación de prueba se añade ristocetina, botrocetina o una sustancia equivalente de ristocetina.

20 En el método de acuerdo con la invención, la trombina usada puede ser trombina recombinante o humana o bovina aislada de fuentes naturales.

En una forma preferida de realización del método de acuerdo con la invención, la trombina y/o la proteína GPIIb están asociadas a una fase sólida.

25 El concepto "asociada" debe entenderse ampliamente 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 depresión. En un enlace covalente, la proteína GPIIb aislada está unida a la fase sólida mediante un enlace químico. Un ejemplo para un enlace no covalente es la adsorción superficial. Aparte de un enlace directo a la fase sólida, la proteína GPIIb aislada o la trombina puede estar unida a la fase sólida también indirectamente mediante interacción específica con otros asociados específicos de unión, por ejemplo mediante interacción específica con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, preferiblemente con un anticuerpo anti-GPIIb o bien con un anticuerpo anti-trombina o - en tanto la proteína aislada disponga de una baliza de afinidad - con un anticuerpo de baliza anti-afinidad.

30 En el sentido de esta invención, el concepto "fase sólida" contiene un objeto que consiste en material poroso y/o no poroso, insoluble en agua y que puede exhibir las más diversas formas, como por ejemplo recipientes, túbulos, placas de microtitulación (placas ELISA), esferas, micropartículas, barras, tiras, papel de filtro o de cromatografía, etc. Por regla general, la superficie de la fase sólida es hidrofílica o puede ser convertida en hidrofílica. La fase sólida puede consistir en los más diversos materiales como por ejemplo en materiales orgánicos y/o inorgánicos, en materiales sintéticos, de ocurrencia natural y/o de ocurrencia natural modificados. Son ejemplos de materiales de fase sólida, polímeros como por ejemplo celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, poliácridamida, moléculas entrecruzadas de dextrano, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nylon; látex; cerámica; vidrio, metales, en particular metales nobles como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de ellos. El concepto "fase sólida" no comprende de modo explícito células, en particular no comprende plaquetas (trombocitos). En todo caso se trata de una fase sólida no trombocitaria.

35 La fase sólida puede exhibir un recubrimiento de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, hidratos de carbono, sustancias lipofílicas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de ellos, por ejemplo para reprimir o impedir la unión no específica de componentes de las muestras a la fase sólida o por ejemplo para alcanzar mejoramientos respecto a la estabilidad de la suspensión en fases sólidas en forma de partículas, a la estabilidad al almacenamiento, la estabilidad al moldeamiento o la resistencia frente a la luz UV, los microbios u otros agentes con efecto dañino.

40 Mediante la puesta en contacto de proteína GPIIb aislada con trombina se forma un complejo de los dos componentes. Si en la muestra de paciente añadida están presentes sustancias que influyen en la formación de este complejo, por ejemplo inhibidores o activadores de GPIIb o trombina, se mide una formación de complejo modificada respecto a la normal. La normal es definida mediante determinación de la interacción de GPIIb-trombina en materiales adecuados de referencia, por ejemplo en un conjunto normal de plasma y puede ser establecida por ejemplo como 100 % de la norma. La interacción de GPIIb-trombina que se determina en una muestra de un individuo, puede ser entonces relacionada con el valor de referencia.

55 En una forma de realización del método de acuerdo con la invención, por lo menos uno de los dos componentes,

por consiguiente GPIIb α y/o trombina, se asocia con una fase sólida particular, preferiblemente con partículas de látex. La formación de complejo entre trombina, proteína GPIIb α y la(s) fase(s) asociada(s) puede ser determinada entonces mediante medición de la aglutinación de las partículas de fase sólida. Para la determinación cuantitativa de la reacción de aglutinación, que tiene correlación con la formación de complejo, puede usarse por ejemplo la dispersión de la luz en agregados de partículas, mediante la medición de la intensidad de la los dispersa (nefelometría) o mediante la medición de la turbidez del medio (turbidimetría).

En otra forma de realización del método de acuerdo con la invención, cada uno de los dos componentes, por consiguiente GPIIb α y trombina, está asociado con un primer y un segundo componente de un sistema de formación de señal, los cuales colaboran de modo que surge una señal detectable cuando el primero y el segundo componentes del sistema de formación de señal son puestos en cercanía espacial uno de otro. Se entiende por colaboración entre los dos componentes, en particular una transferencia de energía - por consiguiente una transferencia directa de energía entre los componentes, por ejemplo por radiación de luz o electrones así como por moléculas químicamente reactivas, como por ejemplo oxígeno singlete transitorio. La transferencia de energía puede ocurrir de uno a otro componente, pero también es posible una cascada de diferentes sustancias, sobre la cual transcurre la transferencia de energía.

Por ejemplo, los componentes pueden ser un par de un donante de energía y un receptor de energía, como por ejemplo agente fotosensibilizador y agente quimioluminiscente (EP-A2-0515194, tecnología LOCi®) o fotosensibilizador y fluoróforo (WO-A1-95/06877) o yodo radioactivo $<125>$ y fluoróforo, o fluoróforo y agente de extinción fluorescente. En otra forma de realización del método de acuerdo con la invención, la trombina está asociada con una fase sólida que no está en forma de partícula, preferiblemente con la superficie de una microplaca de titulación. La formación de complejo entre trombina y proteína GPIIb α puede ser determinada mediante la medición de la cantidad de GPIIb α , que está unida a la trombina por la fase sólida. Para la determinación de la cantidad de GPIIb α , que está unida mediante la trombina a la fase sólida, puede usarse por ejemplo un anticuerpo anti-GPIIb α , que está asociado directa o indirectamente con un componente de un sistema de formación de señal, y con ello permite la determinación cuantitativa de la cantidad de GPIIb α ligada. De modo alternativo, la proteína GPIIb α puede estar asociada con una fase sólida que no está en forma de partícula, y se determina la formación de complejo entre trombina y proteína GPIIb α por medición de la cantidad de trombina, que está unida mediante la proteína GPIIb α a la fase sólida. Para la determinación de la cantidad de trombina, que estuvo unida mediante la GPIIb α a la fase sólida, puede usarse por ejemplo un anticuerpo anti-trombina, que está asociado directa o indirectamente con un componente de un sistema de formación de señal o un sustrato de péptido con un grupo de señal escindible mediante trombina, por ejemplo un grupo de señal cromogénico, fluorogénico o electrogénico.

Otro objetivo de la presente invención es un kit de prueba para la ejecución de un método de acuerdo con la invención, que contiene un primer reactivo, el cual contiene proteína GPIIb α aislada, en el que la proteína GPIIb α hace mutación y, comparada con la secuencia tipo silvestre de la proteína GPIIb α humana, contiene por lo menos los residuos de aminoácido 1-268 y exhibe en por lo menos una de las posiciones 233, 235, 237 y 239 una sustitución Xaa (SEQ ID NO: 1), y un segundo reactivo que contiene trombina. Particularmente se prefiere un kit de prueba que contiene un reactivo, que contiene proteína GPIIb α aislada que hizo mutación, que en por lo menos dos de las posiciones 233, 235, 237 y 239 exhibe en cada caso una sustitución Xaa, preferido de modo particular en las posiciones 233 y 239. De modo muy particularmente preferido, las sustituciones Xaa del residuo de glicina en la posición 233 y del residuo de metionina en la posición 239 de la cadena GPIIb α , consisten en un residuo de valina (G233V o M239V). Otro kit de prueba preferido contiene un reactivo que contiene proteína GPIIb α aislada que ha hecho mutación, que en las posiciones 233, 235 y 239 exhibe en cada caso una sustitución Xaa. De manera preferida, las sustituciones Xaa del residuo de glicina en la posición 233 y del residuo de metionina en la posición 239 de la cadena de GPIIb α consisten en un residuo de valina (G233V o bien M239V) o un residuo de serina (G233S o bien M239S) y la sustitución Xaa del residuo de ácido asparagínico en la posición 235 consiste en un residuo de tirosina (D235Y).

En una forma preferida de realización del kit de prueba, el segundo reactivo puede comprender una fase sólida, a la cual está asociada la trombina. De modo preferido, además tal kit de prueba contiene otro u otros reactivos para la detección de la proteína GPIIb α aislada, que contiene por ejemplo un anticuerpo anti-GPIIb α o un anticuerpo anti-baliza, el cual es marcado directa o indirectamente con una enzima y un sustrato para la enzima, por ejemplo un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano picante y tetrametilbencidina como sustrato cromogénico.

En otra forma de realización del kit de prueba, el primer reactivo puede comprender una fase sólida que está asociada a la proteína GPIIb α que ha hecho mutación. Preferiblemente, además tal kit de prueba contiene otro u otros reactivos para la detección de trombina, que contiene por ejemplo un anticuerpo anti-trombina el cual está marcado directa o indirectamente con una enzima y un sustrato para la enzima, por ejemplo un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano picante y tetrametilbencidina como sustrato cromogénico. De modo alternativo, para la detección de trombina puede usarse también un sustrato de péptido con un grupo de señal escindible mediante

trombina.

Los reactivos pueden estar preparados en forma líquida o liofilizada. Para el caso en que un reactivo esté presente en forma liofilizada, el kit de prueba puede contener adicionalmente un solvente requerido para la suspensión del liofilizado, como por ejemplo agua destilada o un amortiguador adecuado.

5 Descripción de la figura

Figura 1

La Figura 1 muestra el valor de medición de extinción [E] de formulaciones de reacción con diferentes anticuerpos anti-GPIIb en diferentes concentraciones. Los anticuerpos VM16d, SZ2 y 4H12 inhiben la interacción trombina-GPIIb de modo dependiente con la concentración (véase ejemplo 1).

10 Ejemplos

Ejemplo 1: detección de anticuerpos GPIIb inhibidores en una muestra

Se recubrió una placa de microtitulación con anticuerpos contra trombina humana. La trombina humana fue suministrada por Sigma-Aldrich (T7009, Sigma-Aldrich, Hamburgo, Alemania). A cada depresión se añadieron 100 μL de una solución de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de trombina en amortiguador de glicerina (8 mL de agua destilada, 87,7 mg de NaCl, 69 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 813 μL de glicerina al 87 %, 18 μL de Tween® 20, 10 mg de albúmina bovina, 1 mg de IgG bovina, 2 mg de fenol, 18,6 mg de Titriplex I, con aproximadamente 43 μL de NaOH 10 N se ajustó el pH a pH 6,8) y se incubó a temperatura ambiente por una hora. Después de ello se lavó cuatro veces con 300 μL de amortiguador de lavado.

Se usó una proteína GPIIb fusionada con baliza Flag, producida de modo recombinante (aa 1-268), en la cual se reemplazó el residuo de glicina en la posición 233 y el residuo de metionina en la posición 239 en cada caso por un residuo de valina (G233V, M239V). De esta proteína GPIIb se mezclaron en cada caso, 200 μL de una solución 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador de glicerina, con 200 μL de los anticuerpos anti-GPIIb inhibidores 4H12, SZ2 y VM16D o bien del anticuerpo de control AK2 en diferentes concentraciones en amortiguador de glicerina, y se incubó por una hora y 10 minutos a temperatura ambiente. De estas mezclas proteína GPIIb/anticuerpo se transfirieron en cada caso con pipeta 100 μL a una depresión de la placa de microtitulación y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Después de ello se lavó cuatro veces con 300 μL de amortiguador de lavado.

Para la determinación cuantitativa de la proteína GPIIb unida, fusionada con baliza Flag se añadieron en cada caso 100 μL de una solución 0,06 mg/ μL de la peroxidasa M2 anti-Flag (Sigma-Aldrich, Hamburgo, Alemania) en amortiguador de glicerina, por cada depresión y se incubó una hora a temperatura ambiente. Después de lavar cuatro veces con 300 μL de amortiguador de lavado, se añadieron 100 μL de una solución del sustrato cromogénico de peroxidasa TMB (diclorhidrato de tetrametilbencidina) y peróxido de hidrógeno por depresión, y se incubó por 20 minutos. Se detuvo la reacción, y se midió la extinción de la formulación de reacción con una longitud de onda de 450 nm un lector de placas ELISA, usando una longitud de onda de referencia de 650 nm.

En la Figura 1 se representan los valores de medición de extinción.

Se usó el anticuerpo anti-GPIIb AK2 como anticuerpo de control, el cual como se sabe no influye en la unión de trombina a la proteína GPIIb, sino que inhibe la unión inducida por ristocetina de VWF a la proteína GPIIb (Ward, C.M. et al., Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Iba. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Iba as a binding site for von Willebrand factor and α -thrombin. *Biochemistry* 1996, 35: 4929-4938).

El anticuerpo anti-GPIIb 4H12 inhibe la unión de trombina a la proteína GPIIb, como se sabe, de manera muy fuerte (Gralnick, US 5486361 A).

El anticuerpo anti-GPIIb SZ2 (Ruan, C. et al., 1987) está en desarrollo como agente terapéutico inhibidor anti-plaquetas (Yeung, J. & Holinstat, M., 2012).

El anticuerpo anti-GPIIb VM16d es conocido así mismo como anticuerpo que inhibe la unión de trombina a GPIIb (Dubois, C. et al., thrombin binding to GPIIb induces integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ dependent platelet adhesion to fibrin in ex vivo flowing whole blood. *Thromb Haemost* 2004, 91: 233-237).

Como se desprende de la Figura 1, en el método de acuerdo con la invención 4H12, SZ2 y VM16d inhiben la interacción GPIIb-trombina de forma dependiente de la concentración. Por ello, el método es adecuado para la detección de inhibidores de la interacción de GPIIb-trombina en una muestra.

50 Listado de secuencias

ES 2 614 352 T3

<110> Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

<120> método para la determinación de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina

<130> 2013P22440EP

<160> 3

5 <170> versión de PatentIn 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

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

ES 2 614 352 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 2 614 352 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

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 614 352 T3

<400> 2

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

<210> 3

<211> 41

5 <212> PRT

<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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección de moduladores de la interacción de GPIIb-trombina en una muestra, en el que la muestra es puesta en contacto con proteína GPIIb aislada y con trombina aislada y se determina la formación de complejo entre la proteína GPIIb y trombina, caracterizado porque la proteína GPIIb ha hecho mutación y, comparada con la secuencia tipo silvestre de la proteína GPIIb humana, contiene por lo menos los residuos de aminoácidos 1-268 y en por lo menos una de las posiciones 233, 235, 237 y 239 exhibe una sustitución Xaa (SEQ ID NO: 1).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína GPIIb que ha hecho mutación exhibe por lo menos una sustitución del grupo de G233V, G233S, D235Y, D235V, K237V, M239V y M239S.
- 10 3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra no es puesta en contacto con ristocetina o botrocetina.
4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la trombina y/o la proteína GPIIb están asociadas a una fase sólida.
5. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la trombina y/o la proteína GPIIb están asociadas a la fase sólida, mediante un asociado de unión, preferiblemente mediante un anticuerpo.
- 15 6. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la fase sólida es una fase sólida en forma de partículas.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se determina la formación de complejo entre trombina y proteína GPIIb, mediante la aglutinación de la fase sólida en forma de partículas.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la fase sólida es una fase sólida que no está en forma de partículas, preferiblemente es la superficie de una placa de microtitulación.
- 20 9. Kit de prueba para la ejecución de un método de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene un primer reactivo el cual contiene la proteína GPIIb aislada, en el que la proteína GPIIb ha hecho mutación y, comparada con la secuencia tipo silvestre de la proteína GPIIb humana, contiene por lo menos los radicales aminoácidos 1-268 y en por lo menos una de las posiciones 233, 235, 237 y 239 exhibe una sustitución Xaa (SEQ ID NO: 1), y un segundo reactivo que contiene trombina.
- 25 10. Kit de prueba de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el segundo reactivo comprende una fase sólida, a la cual está asociada la trombina.
11. Kit de prueba de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 y 10, que contiene además uno o varios reactivos para la detección de la proteína GPIIb aislada.
- 30 12. Kit de prueba de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el o los reactivo(s) para la detección de la proteína GPIIb aislada comprende(n) un anticuerpo marcado con enzima con especificidad por la proteína GPIIb aislada, y un sustrato para la enzima.
13. Kit de prueba de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el primer reactivo comprende una fase sólida, a la cual está asociada la proteína GPIIb aislada.
- 35 14. Kit de prueba de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 y 13, que contiene además uno o varios reactivos para la detección de trombina.
15. Kit de prueba de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el o los reactivo(s) para la detección de trombina comprende(n) bien sea un anticuerpo marcado con enzima con especificidad por trombina, y un sustrato para la enzima o comprende un sustrato de péptido con un grupo de señal escindible por trombina.

