

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 326**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2013 PCT/EP2013/071816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060568**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013 E 13779219 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2908876**

54 Título: **Proteínas recombinantes derivadas del colágeno con actividad de enlace al factor Willebrand**

30 Prioridad:

**19.10.2012 FR 1259996**

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

**03.07.2017**

73 Titular/es:

**NVH MEDICINAL (50.0%)  
57 rue de la Vannerie  
21000 Dijon, FR y  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE  
DIJON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VANDROUX, DAVID;  
DE MAISTRE, EMMANUEL;  
DUMONT DI LEONE, LAURE y  
COUTARD, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 621 326 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**

Proteínas recombinantes derivadas del colágeno con actividad de enlace al factor Willebrand.

- 5 La invención se refiere a unas proteínas recombinantes que comprenden por lo menos dos motivos derivados del colágeno que permiten que estas proteínas se unan específicamente al factor vonWillebrand (vWF). Estas proteínas pueden ser utilizadas en diferentes ensayos biológicos *in vitro* con el fin de medir la capacidad del factor Willebrand para unirse al colágeno.
- 10 El factor Willebrand es una glicoproteína adhesiva formada por multímeros de alto peso molecular producida por las células endoteliales y los megacariocitos. Se almacena en las plaquetas y se presenta en forma circulante en el plasma. La proteína madura de Willebrand está formada por monómeros de 250 kDa agrupados en multímeros por unos puentes disulfuros que pueden alcanzar una masa del orden de 20 MDa y representar hasta un centenar de monómeros. La multimerización es un proceso principal ya que si todos los multímeros son capaces de unir el factor
- 15 VIII, sea cual sea su tamaño, los multímeros de alto peso molecular son las formas más activas para asegurar la adhesión plaquetaria. La formación de estos multímeros está relacionada con la presencia en la secuencia del monómero de dominios denominados "estructurales", a saber un dominio rico en cisteína (Cysteinknotdomain) y un dominio D3 que permite una multimerización óptima de los dímeros de Willebrand (*Springer TA, J ThrombHaemost. 9 de julio de 2011; Supl. 1:130-43*). Existen varios dominios D en la secuencia del monómero que se distinguen por la presencia de secuencias de consenso que permiten el enlace de las isomerasas disulfidos. Al lado de estos dominios "estructurales" están presentes unos dominios denominados "funcionales" que incluyen tres dominios: A1, A2 y A3 con los dominios A1 y A3 que contienen un sitio de enlace al colágeno, el dominio A1 un sitio de enlace a los receptores plaquetarios Gplb y  $\alpha IIb\beta III$  y el dominio A2, de los sitios de escisión proteolíticos (*Schneppenheim R, Thromb Res.2011;128 Supl. 1:S3-7*).
- 20 La formación de los multímeros de Willebrand está regulada por la proteína ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Motifs) por corte proteolítico a nivel del dominio A2. Una deficiencia de ADAMTS13 conduce al púrpura trombótico trombocitopénico (PTT) consecutivo a la adhesión de las plaquetas a unos multímeros de factor Willebrand de tamaño muy grande en el origen de trombiplaquetaria en la microcirculación y de una hemólisis.
- 25 El factor Willebrand desempeña por lo tanto papel importante permitiendo 1) la adhesión de las plaquetas consecutivamente a una lesión del endotelio y a la exposición del colágeno, volviéndose esta adhesión muy dependiente del factor Willebrand en caso de velocidades de flujo o fuerzas de cizallamiento elevadas y 2) el transporte y la protección del factor VIII de la coagulación en la sangre circulante. A nivel plasmático, su concentración es del orden de 10  $\mu\text{g/ml}$  y los valores plasmáticos de este factor están situados entre 50 y 150 UI/dl en actividad.
- 30 La enfermedad de Willebrand es la enfermedad hemorrágica más frecuente con una prevalencia del orden del 1% en la población general. Se caracteriza por unos sangrados principalmente a nivel de las mucosas. Existen diferentes tipos y sub-tipos de la enfermedad de Willebrand caracterizados por unos defectos cuantitativos y cualitativos de este factor. Es así que se distingue:
- 35 - el tipo 1, que corresponde a una deficiencia cuantitativa parcial en factor Willebrand. Representa del 70 al 80% de los pacientes afectados,
  - 40 - el tipo 3, que corresponde a una deficiencia cuantitativa total de este factor, asociado a hemorragias severas y a un derrumbe marcado del factor VIII,
  - 45 - el tipo 2, que corresponde a una deficiencia cualitativa en Willebrand. Se divide en varios sub-tipos, a saber 1) el sub-tipo 2A que presenta una disminución de la afinidad para las plaquetas relacionada con la ausencia de multímero de alto peso molecular, 2) el sub-tipo 2B, caracterizado por un aumento de la afinidad para el receptor plaquetario Gplb, que se traduce por una eliminación o una pérdida de los multímeros de alto peso molecular, 3) el sub-tipo 2N que posee una disminución de la afinidad para el Factor VIII que se traduce por una deficiencia en factor VIII con un porcentaje de Willebrand normal y 4) el sub-tipo 2M, que agrupa todos los otros tipos de deficiencia de la función del factor Willebrand que no están relacionados con una pérdida de los multímeros de alto peso molecular.
- 50 El factor Willebrand desempeña un papel importante en la interacción indirecta entre el receptor plaquetario Gplb y el colágeno. Las formas multiméricas de alto peso molecular permiten el reclutamiento de las plaquetas a nivel de los sitios lesionados de los territorios vasculares sometidos a velocidades de flujo elevadas. El factor Willebrand se fija al colágeno por medio de sus dominios A3 y A1, mientras que el dominio A1 une además el receptor Gplb plaquetario.
- 55 Los colágenos son los constituyentes estructurales principales de la matriz extracelular de todos los organismos multicelulares. Se trata de una familia de proteínas compuesta por 28 tipos diferentes que desempeñan un papel

durante el desarrollo y en la homeostasis tisular. Son capaces de ensamblarse en diferentes estructuras supramoleculares en forma de fibrillas, de microfibrillas o también de redes. Los colágenos presentan la característica común de contener uno o varios dominios que tienen una estructura en triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas, o cadenas  $\alpha$ , enrolladas unas alrededor de las otras. Esta característica se permite gracias a la presencia, cada tres aminoácidos, de una glicina a nivel de los motivos helicoidales que están constituidos por secuencias repetidas de tipo G-X-Y en la que X es frecuentemente una prolina e Y una hidroxiprolina (*Chen C y Raghunath M. Fibrogenesis Tissue Repair. 15 de diciembre de 2009; 2:7*).

Los colágenos de tipo II y III poseen un sitio único, de alta afinidad, para el dominio A3 del factor Willebrand (*Herr AB y Farndale RW, J BiolChem. 24 de julio de 2009; 284(30):19781-5*). Este motivo peptídico está localizado entre los aminoácidos 403 a 413 y se compone de GPRGQOGVMGFO con ciertos aminoácidos críticos para la fijación al factor Willebrand (*Lisman T et al., Blood. 1 de diciembre de 2006; 108(12): 3753-6*). Esta secuencia peptídica está también implicada en la interacción entre el colágeno de tipo II, III, IV y los receptores DDR1 y DDR2 (Discoidin Domain Receptor) (*Xu H et al., Matrix Biol. Enero de 2011; 30(1): 16-26*), expresados por las células epiteliales y las células de origen mesenquimal respectivamente, así como con la proteína SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine, también denominada osteonectina), implicada en las interacciones célula-matriz extracelular (*Giudici C et al., J BiolChem. 11 de julio de 2008;283(28):19551-60*). Más recientemente, Brondijk *et al.* han descrito los motivos de reconocimiento eventualmente implicados en el enlace del colágeno de tipo I al factor Willebrand, a saber el motivo RGQAGVMF para la cadena alfa 1 y RGEQGNIGF para la cadena alfa 2 que son unos motivos denominados "degenerados" con respecto al motivo RGQOGVMGF presente en la secuencia del colágeno de tipo III (*Brondijk TH et al. Proc NatlAcadSci U S A. 3 de abril de 2012;109(14):5253-8*). Por otro lado, Verkleij *et al.* habían identificado como potencial sitio de enlace los aminoácidos 541 a 558 compuestos por GAAGPOGPOGSAGTOGLQ (*Verkleij et al., Blood. 15 de mayo de 1998; 91 (10): 3808-16*). Este motivo peptídico está localizado entre el motivo Willebrand descrito por Lisman *et al.* y el motivo de enlace a la integrina  $\alpha 1\beta 2$  (motivo GMOGER). Este motivo no se ha recogido después en otros trabajos.

Se señala que Bonnefoy *et al.* han demostrado que el dominio A1 del factor Willebrand podía subsistir al dominio A3 para permitir la fijación de las plaquetas al colágeno para unas velocidades de flujo elevadas sin que haya podido precisar si esta interacción se efectuaba a nivel del mismo sitio de enlace al colágeno que para el dominio A3 (*Bonnefoy A et al. J ThrombHaemost. Octubre de 2006;4(10):2151-61*).

La clasificación de los pacientes que padecen la enfermedad de Willebrand necesita la utilización de diferentes ensayos de laboratorio. La determinación del antígeno del factor de Willebrand (VEF:Ag) se realiza frecuentemente en primera línea en caso de sospecha, pero no permite cuantificar la actividad del factor Willebrand. La utilización de ensayos denominados funcionales, que miden la actividad del factor Willebrand es indispensable para detectar las anomalías funcionales del factor Willebrand que permite la clasificación de los pacientes en los diferentes sub-tipos, en particular cuando estas anomalías no están asociadas a una baja concentración de factor Willebrand. Como se ha precisado anteriormente, el factor Willebrand permite la adhesión de las plaquetas al colágeno haciendo el enlace entre el colágeno y el receptor plaquetario Gplb. Los ensayos funcionales utilizados en la actualidad tienen sobre todo como objetivo el enlace Willebrand/plaquetas.

La medición del enlace del factor Willebrand al colágeno no se utiliza de forma rutinaria, y esto principalmente debido a que los ensayos actuales no son adecuados para urgencias y ni para caso por caso. Sin embargo, la medición del enlace del factor Willebrand al colágeno o VWF:CB (von Willebrand Factor:Collagen Binding) posee una mejor sensibilidad para detectar la presencia de Willebrand de alto peso molecular (*Favaloro EJ, Thromb Haemost. Noviembre de 2010;104(5):1009-21*).

Con el fin de facilitar la clasificación de los pacientes en función de los sub-tipos, se calcula la relación (ratio) entre la actividad enlace de Willebrand a las plaquetas o del colágeno al Willebrand y la concentración del antígeno Willebrand (vWF:Ag). Para los pacientes normales se obtiene una relación actividad/Ag igual o superior y de tipo I a 0,7 y una relación inferior a 0,7 es característica de los sub-tipos 2A, 2B y 2M. Los sub-tipos 2N no se pueden detectar mediante esta medición.

Los ensayos ELISA basados en la medición del enlace de Willebrand al colágeno permiten una buena discriminación entre los pacientes de tipo 1 y de tipo 2A/2B (*Favaloro EJ, Thromb Haemost. Noviembre de 2010;104(5):1009-21*) y entre los tipos 2A y 2M (*Baronciani L et al. J Thromb Haemost. Septiembre de 2006;4(9):2088-90*).

Aunque estos resultados parecen prometedores, existe un debate en cuanto al interés de este ensayo para la clasificación de los pacientes. Este debate se refiere principalmente a la caracterización de la ausencia o no de los multímeros de alto peso molecular, que es una apuesta importante, tanto para ayudar a la clasificación de los pacientes con Willebrand como para los que tienen una deficiencia adquirida de multímeros de alto peso molecular. Existen en la actualidad no menos de 7 kits ELISA comercializados, sin contar los que se desarrollan internamente por algunos laboratorios. Estos kits utilizan unas preparaciones de colágeno de origen y de naturaleza diferentes, lo que complica la comparación de los resultados entre los diferentes estudios. A esto se añade la falta de homogeneidad entre los lotes producidos. Los colágenos clásicamente utilizados son el colágeno de tipo I, de tipo III, de tipo IV y de tipo VI. Estos colágenos de origen animal no son puros al 100% y pueden ser el origen de los

resultados discordantes descritos. De ahí, una necesidad importante de homogeneidad de las preparaciones de colágeno utilizadas, tanto para los ensayos ELISA como para los ensayos que miden el enlace de Willebrand al colágeno en condiciones de flujo. Este punto se ha detallado ampliamente y discutido en una directiva del subcomité Biorhéologie de ISTH que tiende a una estandarización de los ensayos que utilizan el colágeno (*Heemskerk JWM et al. J Thromb Haemost. Abril de 2011;9(4):856-8*).

La ingeniería de proteínas derivadas de la matriz extracelular permite en la actualidad disponer de proteínas que poseen unas propiedades equivalentes a las proteínas nativas (*Werkmeister J y Ramshaw J. Biomed Mater. Febrero de 2012;7(1):012002*). Utilizando las tecnologías del ADN recombinante, es posible obtener, de manera reproducible, unos lotes estables de estas proteínas en cantidad muy alta. A pesar de que los colágenos nativos ya se han producido en células eucariotas con éxito (patente EP 2383338), la producción de proteínas recombinantes derivadas del colágeno procedentes de un procedimiento de ingeniería es un enfoque reciente que no se ha utilizado hasta la fecha para producir unas proteínas derivadas del colágeno capaces de unirse al factor Willebrand y que se utilizan en un ensayo de actividad de este factor, tales como los polipéptidos de la presente invención.

Al contrario que el ensayo de actividad de enlace de Willebrand al receptor plaquetario Gplb que existe en forma automatizada, no existe en la actualidad un ensayo automatizado para la medición del enlace de Willebrand al colágeno. Los ensayos automatizados se basan generalmente en el principio de la aglutinación de partículas recubiertas de un reactivo. El ensayo de aglutinación más utilizado en diagnóstico utiliza unas perlas de látex que, por ahora, no se han podido recubrir de colágeno para su utilización como reactivo. Las propiedades fisicoquímicas de los colágenos utilizados clásicamente y, en particular, el hecho de ser soluble únicamente a pH ácido, complican la utilización de este tipo de perlas. A la inversa, los polipéptidos según la invención son solubles a pH fisiológico, que permite una adsorción óptima en superficie de partículas. Por otro lado, su masa es más pequeña que la de los colágenos nativos, lo que debería permitir una mejor adsorción sobre las partículas. Finalmente, la posible adición por ingeniería de cisteínas en la secuencia del polipéptido permite realizar un injerto dirigido entre una partícula funcionalizada con una función de tipo maleimida en la superficie de la partícula y la cisteína presente en la proteína. Las ventajas específicas de los polipéptidos según la invención acoplados a su actividad permiten el desarrollo del primer ensayo automatizado de la medición del enlace de Willebrand plasmático al colágeno.

### Resumen de la invención

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para determinar la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno en una muestra biológica que comprende las etapas siguientes:

a) Proporcionar un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>-GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,

Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,

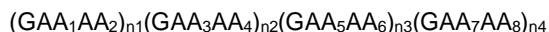
K es un número entero comprendido entre 4 y 15;

b) poner en contacto la muestra biológica con dicho polipéptido;

c) medir el enlace del factor Willebrand de la muestra biológica al polipéptido de la etapa a) para medir la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno.

Los polipéptidos descritos anteriormente presentan una actividad y una afinidad de enlace al factor Willebrand equivalente a la de los colágenos de tipo I y III. Estos polipéptidos presentan unas características fisicoquímicas ventajosas, en particular debido a que son estables a un pH fisiológico, y también por que son capaces de unirse al factor Willebrand en forma no fibrilar.

Preferentemente, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan independientemente un motivo peptídico de fórmula



en la que, independientemente:

- AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>5</sub> y AA<sub>7</sub> representan independientemente los aminoácidos D o A,
- AA<sub>2</sub>, AA<sub>4</sub>, AA<sub>6</sub> y AA<sub>8</sub> representan independientemente los aminoácidos A o P,
- n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> y n<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre 0, 1, 2, 3 o 4 y la suma n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>+n<sub>3</sub>+n<sub>4</sub> es igual a 2, 3 o 4.

Más preferentemente, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan el motivo peptídico GDAGAPGAP de la SEC ID nº 7.

Un segundo objeto de la presente invención es un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Willebrand en un paciente que comprende las etapas siguientes:

a) Proporcionar un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>-GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

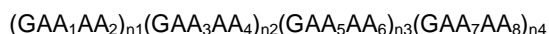
Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
k es un número entero comprendido entre 4 y 15;

b) Poner en contacto una muestra biológica previamente extraída en el paciente con dicho polipéptido;

c) Medir el enlace del factor Willebrand presente en la muestra biológica al polipéptido de la etapa a) para medir la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno.

De manera ventajosa, el procedimiento de diagnóstico se utiliza para diagnosticar los tipos 1, 2, 2A, 2B, 2M y 3 de la enfermedad de Willebrand.

Preferentemente, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan independientemente un motivo peptídico de fórmula



en el que, independientemente

- AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>5</sub> et AA<sub>7</sub> representan independientemente los aminoácidos D o A,
- AA<sub>2</sub>, AA<sub>4</sub>, AA<sub>6</sub> et AA<sub>8</sub> representan independientemente los aminoácidos A o P,
- n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> y n<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre 0, 1, 2, 3 o 4 y la suma n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>+n<sub>3</sub>+n<sub>4</sub> es igual a 2, 3 o 4.

Más preferentemente, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan el motivo peptídico GDAGAPGAP de la SEC ID nº 7.

En modos de realización ventajosos de la invención, los procedimientos de diagnóstico de la enfermedad de Willebrand comprenden además la determinación de la cantidad de factor Willebrand presente en la muestra biológica.

Preferentemente, el polipéptido de la etapa a) se fija sobre un soporte sólido.

Preferentemente, las etapas b) y c) se realizan en condiciones de flujo.

La invención tiene también por objeto un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,

- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 5,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>-GPRGQPGVMGFP et el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
k es un número entero comprendido entre 4 et 15.

En modos de realización preferidos, los polipéptidos según la presente invención se fijan sobre un soporte sólido.

La invención se refiere asimismo a unos kits para determinar la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno que comprende un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido de por lo menos 100 aminoácidos que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>- GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
k es un número entero comprendido entre 4 et 15;  
un reactivo de detección para determinar el enlace del factor Willebrand al colágeno.

Ventajosamente, los kits según la presente invención comprenden además un anticuerpo que se une al factor Willebrand.

Preferentemente, el polipéptido se fija sobre un soporte sólido.

#### Listado de secuencias

SEC ID nº 1: Polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende dos motivos de enlace al factor Willebrand

SEC ID nº 2: Polipéptido que comprende dos motivos de enlace al factor Willebrand

SEC ID nº 3: Polipéptido que comprende un motivo de enlace al factor Willebrand

SEC ID nº 4: Polipéptido que comprende tres motivos de enlace al factor Willebrand

SEC ID nº 5: Polipéptido que comprende cuatro motivos de enlace al factor Willebrand

SEC ID nº 6: Motivo de enlace al factor Willebrand

SEC ID nº 7: Enlazador

SEC ID nº 8: Enlazador-motivo de enlace al factor Willebrand-enlazador-motivo de enlace al factor Willebrand.

#### Descripción detallada de la invención

El factor Willebrand se une al colágeno y unas alteraciones de la actividad de enlace de este factor al colágeno son

el origen de los diferentes tipos de la enfermedad de Willebrand. El colágeno es una proteína difícilmente producida o purificada y cuya manipulación no es fácil. En efecto, debido a su estructura, el colágeno se adhiere a las superficies y no es soluble en agua. La presente invención propone unos polipéptidos recombinantes capaces de sustituir el colágeno en todos los ensayos y unos kits de medición del enlace del factor Willebrand al colágeno. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser producidos en diferentes sistemas celulares de los cuales las células CHO. Son fácilmente purificados y forman unos trímeros en solución cuya estructura es similar a la del colágeno. Estos polipéptidos son, por otro lado, solubles y en particular a pH fisiológico, lo que permite fijarlos fácilmente sobre soportes sólidos tales como perlas de látex por ejemplo.

De manera destacable, los datos experimentales detallados a continuación muestran que los polipéptidos según la invención presentan una actividad y una afinidad de enlace al factor Willebrand igual a la del colágeno III humano. Los polipéptidos según la presente invención encuentran por lo tanto numerosas aplicaciones en los procedimientos, ensayos y en los kits basados en la determinación/medición del enlace del factor Willebrand al colágeno.

La invención se refiere en primer lugar a unos polipéptidos que se unen al factor Willebrand seleccionados de entre:

- el polipéptido de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido de la position 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido de la position 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido de la SEC ID nº 5,
- el polipéptido de la position 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>- GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 k es un número entero comprendido entre 4 y 15.

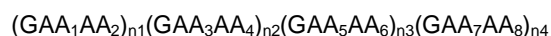
La invención se refiere también a unos polipéptidos que se unen al factor Willebrand seleccionados de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 5,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>- GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 k es un número entero comprendido entre 4 y 15.

Preferentemente, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan independientemente un motivo peptídico de fórmula



en la que, independientemente

AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>5</sub> et AA<sub>7</sub> representan independientemente los aminoácidos D o A,

AA<sub>2</sub>, AA<sub>4</sub>, AA<sub>6</sub> et AA<sub>8</sub> representan independientemente los aminoácidos A o P,

5 n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> et n<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre 0, 1, 2, 3 o 4 y la suma n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>+n<sub>3</sub>+n<sub>4</sub> es igual a 2, 3 o 4. Más preferentemente, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan el motivo peptídico GDAGAPGAP de la SEC ID n° 7.

10 Los polipéptidos según la presente invención comprenden por lo menos dos motivos de enlace al factor Willebrand de fórmula GPRGQPGVMGFP (SEC ID n° 6) separados por un enlazador. Unos enlazadores de este tipo se describen a continuación.

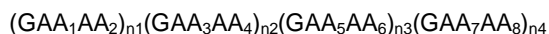
15 Preferentemente, los polipéptidos según la presente invención comprenden un motivo de tipo GPRGQPGVMGFP-Enlazador-GPRGQPGVMGFP y más preferentemente un motivo de tipo "Enlazador -GPRGQPGVMGFP- Enlazador - GPRGQPGVMGFP - Enlazador".

20 En un modo de realización preferido de la invención, los polipéptidos comprenden un motivo de tipo (GPP)<sub>k</sub> - Enlazador -GPRGQPGVMGFP- Enlazador -GPRGQPGVMGFP o un motivo de tipo GPRGQPGVMGFP-Enlazador -GPRGQPGVMGFP - Enlazador - (GPP)<sub>k</sub>.

25 En un modo de realización de la presente invención, los polipéptidos según la presente invención comprenden el motivo de la SEC ID n° 8.

Se puede utilizar como enlazador cualquier secuencia de aminoácidos. Preferentemente, el enlazador comprende de 6 a 12 aminoácidos.

25 En un modo de realización preferido, el enlazador representa un motivo peptídico de fórmula



30 en la que, independientemente

AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>5</sub> et AA<sub>7</sub> representan independientemente los aminoácidos D o A,

AA<sub>2</sub>, AA<sub>4</sub>, AA<sub>6</sub> et AA<sub>8</sub> representan independientemente los aminoácidos A o P,

35 n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> y n<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre 0, 1, 2, 3 o 4 y la suma n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>+n<sub>3</sub>+n<sub>4</sub> es igual a 2, 3 o 4. Más preferentemente, el enlazador representa el motivo peptídico GDAGAPGAP de la SEC ID n° 7.

40 El motivo peptídico de fórmula (GPP)<sub>k</sub>, en la que k es un número entero comprendido entre 4 y 15, permite la trimerización del polipéptido según la presente invención. Preferentemente, en la fórmula (GPP)<sub>k</sub>, k es igual a 10. Este motivo de trimerización se sitúa ventajosamente en uno de los extremos del polipéptido con respecto al motivo de enlace al factor Willebrand y separado de este último por un número variable de aminoácidos.

45 La invención se refiere también a los polipéptidos que tienen por lo menos un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% de identidad con uno de los polipéptidos siguientes:

- el polipéptido de la SEC ID n° 2,
- el polipéptido de la position 24 a la posición 184 de la SEC ID n° 2,
- el polipéptido de la SEC ID n° 4,
- 50 • el polipéptido de la position 24 a la posición 205 de la SEC ID n° 4,
- el polipéptido de la SEC ID n° 5,
- el polipéptido de la position 24 a la posición 226 de la SEC ID n° 5.

55 Por aminoácidos idénticos, se entienden unos aminoácidos invariables o sin alterar entre dos secuencias. Estos polipéptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de referencia.

60 Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, en el sentido de la presente invención, se entiende un porcentaje de restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la mejor alineación (alineación óptima), siendo este porcentaje puramente estático y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas al azar y sobre toda su longitud. Este porcentaje de identidad entre dos polipéptidos puede ser determinado por un algoritmo de identidad global tal como se describe por Needleman y Wunsch (1970).

65 Preferentemente, los polipéptidos que presentan un porcentaje de identidad con los polipéptidos de la presente invención conservan las propiedades del polipéptido de referencia. Preferentemente, estos polipéptidos conservan su capacidad de enlace al factor Willebrand y su solubilidad en agua, en particular a pH fisiológico.



Los polipéptidos de la presente invención comprenden típicamente entre 150 y 300 aminoácidos.

5 Para su utilización en ensayos de enlace al factor Willebrand, los polipéptidos de la presente invención pueden ser fijados sobre cualquier tipo de soporte sólido, tal como microplacas para ensayos ELISA o sobre perlas, incluyendo las perlas de látex o las perlas de oro.

10 La invención tiene también por objeto unos polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la presente invención, tales como el polinucleótido de la SEC ID nº 1.

10 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento para determinar la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno en una muestra biológica que comprende las etapas siguientes:

15 a) Proporcionar un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- 20 • el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>-GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

25 en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
k es un número entero comprendido entre 4 y 10;

30 b) Poner en contacto la muestra biológica con dicho polipéptido;

c) Medir el enlace del factor Willebrand de la muestra biológica al polipéptido de la etapa a).

35 En la última etapa del procedimiento, la medición del enlace del factor Willebrand de la muestra biológica al polipéptido según la invención da una medición del enlace del factor Willebrand al colágeno y en particular al colágeno III humano.

40 Este procedimiento se puede utilizar con los polipéptidos según la presente invención tales como se han descrito anteriormente.

La invención se refiere también a un procedimiento de diagnóstico en un paciente que padece o que se sospecha que padece una forma de la enfermedad de Willebrand que comprende las etapas siguientes:

45 a) Proporcionar un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- 50 • el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>-GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

55 en los que, independientemente

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
60 k es un número entero comprendido entre 4 y 10;

b) Poner en contacto una muestra biológica previamente extraída en el paciente con dicho polipéptido;

c) Medir el enlace del factor Willebrand presente en la muestra biológica al polipéptido de la etapa a).

65 La invención se refiere también a un método de diagnóstico en un paciente que padece o que se sospecha que

padece una forma de la enfermedad de Willebrand que comprende las etapas siguientes:

a) Extracción de una muestra biológica del paciente,

5 b) Poner en contacto la muestra biológica extraída del paciente con un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico  $Z_1$ -GPRGQPGVMGFP- $Z_2$ -GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico  $(GPP)_k$

10

15

en los que, independientemente

$Z_1$  representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 $Z_2$  representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 $k$  es un número entero comprendido entre 4 y 15;

20

c) Medir el enlace del factor Willebrand presente en la muestra biológica al polipéptido de la etapa a).

25

En los procedimientos de la presente invención, la última etapa del procedimiento que comprende la medición del enlace del factor Willebrand de la muestra biológica al polipéptido según la invención da una medición del enlace del factor Willebrand al colágeno y en particular al colágeno III humano.

Estos procedimientos pueden ser utilizados con los polipéptidos según la presente invención, tales como se han descrito anteriormente.

30

Por muestra, se entiende en particular cualquier muestra que contiene o que es susceptible de contener el factor Willebrand, del cual se busca determinar la actividad de enlace al colágeno y en particular al colágeno de tipo III humano. Puede tratarse en particular de una muestra biológica, previamente extraída en un paciente. En unos modos de realización preferidos, la muestra biológica es sangre, plasma, plasma rico en plaquetas, tejido biológico, órgano biológico o un fluido corporal.

35

Los procedimientos según la presente invención comprenden una puesta en contacto de la muestra con por lo menos un polipéptido según la presente invención. Esta puesta en contacto se efectúa según unos métodos clásicos bien conocidos por el experto en la materia. Esta puesta en contacto se efectúa así típicamente en un medio acuoso y más preferentemente en un tampón que garantiza la estabilidad tridimensional de los polipéptidos y desprovisto de proteasas. En un modo de realización preferido, esta etapa se realiza en un tampón fosfato.

40

Ventajosamente, el polipéptido según la invención se puede fijar sobre un soporte sólido. El polipéptido puede ser fijado sobre cualquier tipo de soporte natural o sintético, en particular cualquier polímero natural o sintético. Este soporte sólido se selecciona, por ejemplo, de entre el plástico, el poliestireno, el vidrio, el metal.

45

En un modo de realización, el polipéptido según la invención se fija en por lo menos un pocillo de microplaca de tipo placa ELISA por ejemplo.

50

En otro modo de realización, el polipéptido se fija sobre perlas de vidrio, de plástico, de polímero o de metal, tales como perlas de látex o de oro, por adsorción o enlace covalente en particular.

La medición del enlace del factor Willebrand de la muestra biológica al polipéptido según la invención se efectúa según cualquier método apropiado. Estos métodos son bien conocidos por el experto en la materia. Se citarán en particular los métodos ELISA o los ensayos de aglutinación y de agregación y los ensayos en condición de flujo.

55

Esta medición se puede realizar en condiciones estáticas en ausencia de cualquier agitación del medio en el que se efectúa el enlace.

60

En otros modos de realización, la medición del enlace se realiza en condiciones de flujo con el fin de reproducir las condiciones de circulación sanguínea. Esta determinación permite medir la actividad del enlace del factor Willebrand con colágenos humanos o animales de tipo diferente (tipos I, II, III, VI por ejemplo) en las condiciones fisiológicas de la circulación sanguínea. Los equipos y métodos para realizar estas mediciones son bien conocidos por el experto en la materia, como la resonancia plasmónica de superficie.

65

La medición del enlace del factor Willebrand a los polipéptidos según la invención puede ser suficiente para

establecer un diagnóstico de la enfermedad de Willebrand. En particular, los procedimientos según la presente invención permiten establecer el diagnóstico de tipos 1, 2, 2A, 2B, 2M y 3 de la enfermedad de Willebrand.

5 En algunos modos de realización, los procedimientos según la invención comprenden además una cuantificación del factor Willebrand presente en la muestra. Esta cuantificación puede efectuarse según cualquier técnica habitual. En un modo de realización, esta cuantificación del factor Willebrand en la muestra biológica se efectúa con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra el factor Willebrand. En este modo de realización, el procedimiento según la invención comprende una medición de la actividad del factor de Willebrand y más particularmente de su actividad de enlace al colágeno (determinación funcional) y una medición de la cantidad de factor Willebrand presente en la muestra biológica (determinación cuantitativa).

Clásicamente, la medición de la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno combinado con la cuantificación del factor Willebrand en la muestra permite determinar la relación:

$$R = \frac{\text{factor Willebrand unido al polipéptido (actividad)}}{\text{factor Willebrand presente en la muestra biológica (antígeno)}}$$

15 La determinación de esta relación permite en particular establecer un diagnóstico o afinar el diagnóstico de la enfermedad de Willebrand y más particularmente distinguir los tipos 1 y 3 (deficiencia cuantitativa) y los tipos 2 (deficiencia cualitativa) de la enfermedad de Willebrand. Los procedimientos de la presente invención permiten también distinguir y/o establecer un diagnóstico de los tipos 1, 2, 2A, 2B, 2M y 3 de la enfermedad de Willebrand.

20 La invención se refiere también a unos kits para determinar la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno que comprende un polipéptido tal como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el polipéptido se fija sobre un soporte sólido tal como una perla de látex o una perla de oro.

25 El kit comprende además un reactivo de detección para determinar el enlace del factor Willebrand al colágeno. Este reactivo de detección puede ser cualquier reactivo utilizado habitualmente. Puede tratarse de un marcador tal como un fluoróforo fijado sobre el polipéptido según la presente invención. En un modo de realización, se trata de un anticuerpo que se fija al polipéptido según la invención o al factor Willebrand. Este anticuerpo puede ser marcado con el fin de facilitar su detección. Preferentemente, el kit comprende además un anticuerpo que se une al factor Willebrand.

## Figuras

35 Figura 1: Perfil proteico representativo de las fracciones purificadas del polipéptido según la invención (SEC 2) digerido o no con pepsina. N = fracción normal no digerida, P = fracción digerida con pepsina y M = marcador de peso molecular. En la fracción N, se observa una banda mayoritaria de 70 kDa que se encuentra en la fracción P. Esta banda corresponde por lo tanto al polipéptido según la invención estructurado en triple hélice.

40 Figura 2: Medición de la actividad de enlace del factor Willebrand purificado (Wilfactin) sobre diferentes polipéptidos según la invención que poseen un motivo (SEC 39 o dos motivos (SEC 2) así como sobre el colágeno de tipo III que sirve de referencia (BD Biosciences) y sobre unas proteínas endógenas o HCP (Host Cell Protein) que sirve de control negativo. A = polipéptidos recubiertos a 10 µg/ml y B = polipéptidos recubiertos a 2 µg/ml. Se observa que se necesitan por lo menos 2 motivos de enlace al factor Willebrand para obtener un enlace del factor Willebrand equivalente al del colágeno de tipo III nativo. Media +/- DE, siendo n = 2.

45 Figura 3: Medición del enlace del factor Willebrand (Wilfactin) con 2 UI/dL sobre el polipéptido según la invención (Sec 2) digerido o no por la pepsina y recubierto con 2 µg/ml. Se observa un aumento de un factor 3 de la actividad de enlace del factor Willebrand cuando el polipéptido según la invención es digerido con pepsina. Media +/- DE siendo n = 2.

50 Figura 4: Medición del enlace al polipéptido según la invención (SEC 2) y al colágeno de tipo III recubierto con 2 µg/ml para diferentes concentraciones en factor Willebrand (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 1 y 2 UI/dL). El polipéptido según la invención posee la misma actividad de enlace del factor Willebrand y la misma sensibilidad que el colágeno III nativo. Media +/- DE siendo n = 2.

55 Figura 5: Medición del enlace de factor Willebrand utilizado con 2 UI/dL para diferentes concentraciones de polipéptido según la invención (SEC 2) y de colágeno de tipo III (0; 0,032; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 µg/ml). Media +/- DE siendo n = 2.

60 Figura 6: Medición del enlace del factor Willebrand plasmático sobre el polipéptido según la invención recubierto con 2 µg/ml para diferentes diluciones de un plasma control. Los resultados muestran una linealidad del enlace del factor Willebrand con el polipéptido según la invención con una curva de regresión lineal que presenta un R<sup>2</sup> a 0,9976. Se observa también una buena reproducibilidad de los resultados obtenidos con el polipéptido según la invención. Media +/- DE siendo n = 10.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Construcción del vector que codifica para el polipéptido según la invención que contiene una etiqueta 6xHIS

La secuencia nucleotídica que codifica para los polipéptidos según la invención procede del vector pUC57-NVH020B que contiene el péptido señal del colágeno de tipo III (posición 1 a 23 de la secuencia nucleotídica del polipéptido según la invención). Esta secuencia se inserta en un vector de expresión dedicado a las células de mamífero: pcDNA3.1 + (INVITROGEN). Este vector contiene, entre otros, los elementos siguientes:

- Un promotor CMV,
- Un sitio de clonación múltiple para insertar la secuencia nucleotídica de interés,
- Un casete de resistencia a la geneticina para la expresión en células de mamífero,
- Un casete de resistencia a la ampicilina para la expresión en bacterias.

Para permitir la inserción del polipéptido según la invención, se han insertado unos sitios de restricción a ambos lados de la secuencia nucleotídica. Se trata del sitio de restricción NheI en 5' y del sitio de restricción BamHI en 3'. Para facilitar la purificación del polipéptido según la invención, se añade un tag 6 X histidina en 5' o en 3' de la secuencia del polipeptídico. Con el fin de poder retirar este tag posteriormente, se ha insertado una secuencia de escisión a la TEV (TabaccoEtch Virus) entre la secuencia nucleotídica del tag 6 X histidina y la secuencia que codifica para el polipéptido según la invención.

Todos los plásmidos finales se secuencian para verificar que no se ha introducido ninguna mutación en el ADN de la proteína de interés y en los elementos aportados.

### Ejemplo 2. Expresión de la proteína de fusión según la invención en las células CHO

Se ha realizado un pre-cultivo de las células CHO-S (INVITROGEN) de 3 semanas antes de la transfección. Las células se mantienen en un medio dedicado a las células CHO (Power-CHO, EXCEL 302, proCHO4, proCHO5, etc.) complementado con 4 mM de L-glutamina (LONZA) y 1X de proHT (LONZA) en un matraz de agitación (shakeflask) de 125 ml y en condiciones agitadas (80 rpm) en una incubadora a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Dos días antes de la transfección, las células se pasan a 5·10<sup>5</sup> células viables/ml mediante un cambio completo del medio utilizado y se cultivan en 12,5 ml de medio dedicado a las células CHO completo en un matraz de agitación (shakeflask) de 125 ml.

El día de la transfección, 5·10<sup>6</sup> células viables se peletizaron por centrifugación (5 min. a 1000 g), después recogidas en 5 ml de medio RPMI (Lonza) complementado con 4 mM de L-Glutamina (Lonza) y 1X de ProHT (Lonza). Se reparten entonces cuatro ml de suspensión en 4 matraces de agitación (shakeflasks) de 25 ml (1 ml por flask) que contiene 9 ml de medio RPMI completo (1·10<sup>6</sup> células viables por matraz de agitación (shakeflask)). Las células CHO-S son entonces transfectadas con el vector que contiene la secuencia que codifica para el polipéptido según la invención descrito anteriormente. Un control positivo de transfección se realiza transfectando las células con el vector pMAX-GFP y un control negativo de la transfección se realiza transfectando las células con un vector que no posee el casete de resistencia a la geneticina. La transfección se realiza con la ayuda del agente de transfección Fecturine (PolyMás Transfección) o cualquier otro agente de transfección adecuado y según el protocolo comercial del producto optimizado. Para la Fecturina, las condiciones de transfección elegidas son 6 µg de ADN para 12 µl de Fecturina (relación ADN/Agente de transfección = ½). El experto en la materia sabrá definir el agente de transfección más adecuado para una transfección denominada transitoria o para una transfección denominada estable. Ya se trate de un modo de transfección denominado transitorio o estable, las células se incuban en presencia de complejos de transfección en condiciones estáticas a 37°C y un 5% CO<sub>2</sub>. A 4h post-transfección, las células se resuspenden en un medio dedicado a las células CHO completo, y a 24h post-transfección, se realiza una cuantificación de la eficacia de transfección sobre los controles positivos y negativos de transfección por citometría de flujo.

Para la producción del polipéptido según la invención en modo denominado transitorio, se realiza una primera extracción de sobrenadante a D+3, después se detiene el cultivo a D+5. El medio que contiene el polipéptido según la invención segregado por las células se recupera después de la centrifugación a 3 000 g durante 10 minutos, permitiendo la eliminación de las células, y se congeló a -20°C.

Para la producción del polipéptido según la invención en modo denominado estable, las células se resuspenden y se realiza un recuento celular a las 48 horas de la post-transfección. La totalidad de las células se centrifuga después a 1000 g durante 5 min y después se inoculan a 3·10<sup>5</sup> células viables/ml en un medio dedicado a las células CHO complementado + geneticina (G418 Merck) a 700 µg/ml. Las células se mantienen después tres veces por semana. La totalidad de las células se inocula en 12,5 ml final de medio completo + G418 en matraz de agitación (ShakeFlasks) de 125 ml. Se observa una disminución de la concentración celular y/o de la viabilidad celular en la primera semana de cultivo bajo presión de selección. La viabilidad celular aumenta de nuevo después de 2-3 semanas bajo presión de selección. Cuando el cultivo alcanza más del 95% de viabilidad, se realiza una

crioconservación con  $5 \cdot 10^6$  células viables/ampolla (con un total de 10 ampollas). Las células se congelan en el medio dedicado a las células CHO + 20% de DMSO.

### Ejemplo 3. Producción de la proteína de fusión según la invención en las células CHO

Las células modificadas genéticamente para producir el polipéptido según la invención se descongelan y se mantienen en un medio adecuado. Las células se mantienen a  $3 \cdot 10^5$  células viables/ml durante una a dos semanas. Las células se colocan en 12,5 ml de medio final y se colocan en un matraz de agitación (shakeflask) de 125 ml en un agitador LabTherm® Kühner agitado a 80 rpm, regulado con el 5% de CO<sub>2</sub> y con una humedad comprendida entre el 40 y el 80 %. Después, las células se amplifican con el fin de obtener la cantidad necesaria para realizar una producción. La amplificación consiste en mantener las células en unos volúmenes más elevados en cada mantenimiento para guardar todas las células a una concentración viable.

Cuando se obtiene la cantidad de células necesaria para la producción, se puede poner en marcha la producción. Las células se inoculan a  $3 \cdot 10^5$  células viables/ml. La producción se puede realizar en diferentes equipos: matraces de agitación (shakeflask) dispuestos en un agitador LabTherm® Kühner, Cultibag RM 20/50® (Sartorius), CellReady® (Merck Millipore), BioBundle® (Applikon) y otros equipos equivalentes, de misma escala o de escala superior. El cultivo de las células se realiza durante 5 días o más, con un máximo de 10 días, según las condiciones de realización del cultivo. Cada día, los parámetros de la producción se controlan, así como la concentración celular y la viabilidad celular. Durante la producción, se pueden añadir unos componentes tales como unos aminoácidos, unas vitaminas, glucosa o cualquier otro elemento que presenta un interés para la producción o para las células. En este caso, se trata de un cultivo en modo "fed - batch" o "semicontinuo" que permite cultivar las células durante como máximo 21 días. Si no se añade ningún compuesto durante el cultivo, se habla de cultivo en modo "batch" o "discontinuo".

### Ejemplo 4. Aislamiento por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión

Las células y restos celulares presentes en el medio que contiene el polipéptido según la invención se eliminan por centrifugación o filtración en profundidad (POD Millistak+® Merck Millipore o cualquier otro tipo de soporte equivalente) o filtración tangencial sobre una membrana que presenta un límite de corte de 0,2 µm. El sobrenadante obtenido se purifica por cromatografía de afinidad sobre una columna quelada con un metal tal como el níquel, el cobalto, el zinc o el cobre. Con el fin de favorecer el enlace del polipéptido según la invención, se añade un tampón que contiene de 0 a 50 mM imidazol, de 0 a 500 mMNaCl, de 5 a 20 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y de 5 a 20 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) al sobrenadante y se ajusta a un pH entre 7 y 8. La elución del polipéptido según la invención o bien se realiza mediante un gradiente utilizando una mezcla de dos tampones (tampón 1: 500 mM imidazol, 500 mMNaCl, 10 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O); tampón 2: 20 mM imidazol, 500 mMNaCl, 10 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O)), o bien de manera isocrática, con un tampón que contiene de 50 a 500 mM imidazol, de 0 a 500 mMNaCl, de 5 a 10 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y de 5 a 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O). Eventualmente, con el fin de mejorar la pureza del polipéptido según la invención, se pueden añadir otras etapas de purificación. Puede tratarse de filtraciones, de cromatografía de intercambio de iones, de cromatografía de afinidad, de cromatografía de interacción hidrófoba, de exclusión estérica, o de cualquier otro tipo de cromatografía.

Las fracciones de elución de interés se separan en un gel de electroforesis en condiciones nativas y se tiñen con azul de Coomassie, antes de ser agrupadas según su perfil y se dializan en agua o un tampón fosfato o cualquier otro tampón adecuado para la conservación del polipéptido según la invención. La concentración del polipéptido se determina mediante el kit Sircol® (TebuBio) según las instrucciones del fabricante o por el ensayo de Bradford o cualquier otro ensayo adecuado para la cuantificación del polipéptido de la invención. En algunos modos de realización de la invención, el extracto proteico obtenido se digiere por la pepsina con el fin de determinar si el polipéptido según la invención está estructurado en triple hélice debido a la presencia, en la secuencia del polipéptido según la invención, de una repetición de 10 veces el motivo GPP, descrito como que permite la trimerización de proteínas y péptidos derivados del colágeno. En un modo privilegiado de realización, la digestión por la pepsina se realiza incubando el extracto proteico que contiene el polipéptido según la invención durante 5-6 horas en un baño maría a 37°C en presencia de pepsina en una relación (concentración extracto proteico)/(concentración pepsina) de 20 por 1. La pepsina se reconstituye en un tampón 20 mM acetato de sodio ajustado a pH 4 con ácido acético. La mezcla extracto proteico/pepsina debe tener un pH ácido. El pH se ajusta con ácido acético y se verifica sobre papel de pH. Después de la digestión, la reacción se detiene con 1/10 del volumen de mezcla de reacción de 2 M Tris pH 11,4 con el fin de obtener una solución a pH básico. La mezcla de reacción se pasa después o no sobre unos "cut off" para eliminar los fragmentos digeridos, concentrar y/o dializar la muestra contra cualquier tampón adecuado para la conservación del polipéptido según la invención así digerido. La digestión de las fracciones se verifica por migración de estas últimas sobre un gel de electroforesis, en condiciones nativas y se tiñe de azul de Coomassie.

La figura 1 presenta un perfil de electroforesis que muestra la presencia del polipéptido según la invención en el conjunto de las diferentes fracciones obtenidas después de la purificación sobre columna de afinidad. La banda principal obtenida tiene un peso molecular alrededor de 70 kDa. Se puede también observar la presencia de bandas que corresponden a proteínas de pesos moleculares de 14, 15, 17, 18, 30, 50, 60, 80, 150, 190, 250 y >250 kDa.

Cabe señalar que el colágeno se describe como no migrando a la masa molecular esperada, aquí aproximadamente 50 kDa para el polipéptido de la SEC 2 cuando está en forma de trímero. La digestión por la pepsina del extracto proteico obtenido confirma que la banda a 70 kDa corresponde claramente al polipéptido según la invención, estructurado en forma de una triple hélice resistente a la digestión por la pepsina. El peso molecular de 70 kDa puede también explicarse por la presencia de modificaciones post-traduccionales a nivel de las cadenas alfa del polipéptido según la invención.

#### **Ejemplo 5. Método de determinación de la actividad de enlace del Willebrand mediante un ensayo ELISA**

Uno de los modos de realización de la presente invención consiste en la medición de la actividad de enlace del factor Willebrand al polipéptido según la invención mediante la técnica denominada ELISA, realizada en placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp). Para ello, se añade un volumen de 100  $\mu$ l de una solución que contiene el polipéptido a 2 o 10  $\mu$ g/ml en un tampón fosfato o cualquier otro tampón adecuado, en cada pocillo y se incuba durante 18-20 h a 22°C. Después de tres lavados con 200  $\mu$ l de PBS-0,05% Tween, se añaden 200  $\mu$ l de una solución de BSA al 1% en un tampón fosfato (Euromedex, filtrada sobre 0,45  $\mu$ m) en cada pocillo y se incuba durante 2 h a temperatura ambiente (22°C). Después de tres lavados con 200  $\mu$ l de PBS-0,05% Tween, 100  $\mu$ l de diferentes concentraciones (expresadas en UI/dL) de factor Willebrand purificado (Willfactin 100 UI/mL, LFB) y/o de plasma de paciente diluido en tampón fosfato o cualquier otro tampón adecuado se incuban durante 1h30 a temperatura ambiente (22°C). Después de tres nuevos lavados, se incuban durante 1 h a 22°C 100  $\mu$ l de una solución que contiene un anticuerpo primario anti-vWF acoplado con peroxidasa de rábano picante (Rabbit anti-human VWF/HRP, DAKO) diluido al 1/8000 en un tampón fosfato o cualquier otro tampón adecuado, después se realizan 4 lavados como se ha descrito anteriormente. Se añaden después 125  $\mu$ l de solución de tetrametilbencidina como sustrato para la peroxidasa (TMB, Sigma), después se incuba durante 10 a 45 minutos máximo en oscuridad. La reacción se interrumpe mediante adición de 125  $\mu$ l de GCI 2N (Sigma). La absorbancia se mide rápidamente a 450 nm en un espectrofómeto (Wallaxvictor 3). Se realiza un blanco sustituyendo el vWF o el plasma por un tampón fosfato o cualquier otro tampón adecuado.

La figura 2 presenta un resultado obtenido por ELISA del enlace del factor Willebrand purificado (Willfactin, LFB) utilizado a 0; 0,4 y 2 UI/dL final con los polipéptidos según la invención que corresponden a la SEC 2, a la SEC 3, al colágeno de tipo III (BD Biosciences, control positivo) y a las HCP (Host Cell Proteins, obtenidas de la misma manera que los polipéptidos según la invención a partir de células CHO no transfectadas, control negativo), que contiene respectivamente dos (SEC 2) y un (SEC 3) motivos de reconocimiento al factor Willebrand. Estos diferentes polipéptidos se utilizan a 10 o 2  $\mu$ g/ml (Fig. 2A y 2B). Los resultados muestran que sólo el polipéptido según la invención que contiene por lo menos dos motivos (SEC 2) de reconocimiento al factor Willebrand es capaz de unir este factor de manera equivalente al colágeno de tipo III de referencia.

La figura 3 presenta un resultado obtenido por ELISA del enlace del factor Willebrand purificado (willfactin, LFB) utilizado a 2 UI/dL al polipéptido según la invención (SEC 2) después de la digestión o no por la pepsina y obtención de una fracción pura que contiene la forma en triple-hélice del polipéptido según la invención. El enlace de Willebrand se mide para una concentración de 5  $\mu$ g/ml de cada polipéptido. Los resultados muestran un fuerte aumento de la capacidad de enlace del polipéptido según la invención cuando está únicamente en forma de un triple-hélice. Estos resultados indican que el tratamiento con pepsina permite digerir los contaminantes proteicos eventuales, procedentes de las células CHO-S y capaces de unirse a la columna de afinidad a base de níquel o de cobalto, y/o digerir los polipéptidos según la invención no estructurados en triple-hélice. Este resultado sugiere también que es la forma en triple hélice que lleva la actividad del polipéptido según la invención.

La figura 4 presenta la medición del enlace para diferentes concentraciones en factor Willebrand (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 1 y 2 UI/dL) del polipéptido según la invención (SEC 2) y del colágeno de tipo III recubierto de 2  $\mu$ g/ml. Se observa que el polipéptido según la invención tiene una sensibilidad equivalente a la del colágeno de tipo III para las bajas concentraciones en Willebrand. Este punto es particularmente importante ya que el objetivo del ensayo que utiliza el polipéptido según la invención es determinar una actividad para unos valores plasmáticos en Willebrand muy bajos, tales como se observan para los pacientes de tipo 2.

La figura 5 presenta un resultado obtenido por ELISA del enlace del factor Willebrand purificado (Willfactin, LFB), utilizado a 2 UI/dL al polipéptido según la invención (SEC 2) y al colágeno de tipo III utilizados a 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 y 0,03125  $\mu$ g/mL. Los resultados confirman que el polipéptido según la invención es capaz de unirse al factor Willebrand de manera equivalente al colágeno de tipo III utilizado como referencia con la misma sensibilidad.

La aplicación del polipéptido según la invención se refiere a la medición de la actividad de enlace al factor Willebrand presente en el plasma de pacientes sanos o portadores de la enfermedad de Willebrand. La figura 6 presenta la medición del enlace del factor Willebrand plasmático al polipéptido según la invención para diferentes diluciones de un plasma de referencia, es decir al 1/50, al 1/100, al 1/200, al 1/400 y al 1/800. Estas diluciones son las clásicamente utilizadas para la determinación de la curva estándar obtenida a partir de un plasma de referencia e indispensable para el cálculo de la actividad de enlace del colágeno al Willebrand para un paciente dado. Los resultados muestran la linealidad del enlace del factor Willebrand plasmático al polipéptido según la invención con

una recta de regresión lineal que posee un coeficiente de correlación  $R^2$  igual a 0,9976.

La medición del enlace del factor Willebrand al colágeno debe permitir facilitar la clasificación de los pacientes en los diferentes grupos de la enfermedad de Willebrand. La tabla I presenta los valores obtenidos por ELISA de plasmas de pacientes que pertenecen al tipo I, al tipo II o con sospecha de la presencia de anticuerpos anti-vWF (que imita un tipo III) frente a pacientes sanos, y la relación medición de actividad (CollagenBinding)/medición antigénica (Ag). Se constata que esta relación es muy superior a 0,7 para los pacientes de tipo I, inferior a 0,7 para los pacientes de tipo II, y que los pacientes de tipo III o que poseen unos anticuerpos anti-vWF tienen unos % CB y % Ag casi nulos, lo que confirma el interés del polipéptido según la invención para la clasificación de estos pacientes. Cabe señalar que el polipéptido según la invención distingue mejor los pacientes de tipo I y II que el colágeno de tipo III (un 100% de correlación con los datos clínicos frente al 78%).

Tabla I: Clasificación de los pacientes sanos y patológicos en función de su relación factor Willebrand CB/Ag (medición de la actividad /CollagenBinding)/medición antigénica (Ag)), siendo la medición o bien sobre el polipéptido que tiene la o que es de secuencia SEC 2, o bien en el colágeno de tipo III que sirve de referencia (BD Biosciences) recubierto con 2 µg/ml. El polipéptido de secuencia SEC 2 permite distinguir los pacientes de tipo I de los pacientes de tipo II, con un porcentaje de correlación a los datos clínicos mejor que con el colágeno de tipo III (un 100% frente al 78%).

pacientes	Sec 2						Colágeno III					
	%CB med.	%AG	Rel. CB/Ag	interpretación	clasificación	Correlación	% CB med.	%AG	Rel. Co/Ag	interpretación	Clasificación	Correlación
paciente 1	150	117	1,28	normal	normal	sí	164	117	1,40	normal	normal	sí
paciente 2	150	86	1,74	normal	normal	sí	105	86	1,22	normal	normal	sí
paciente 3	59	45	1,31	tipo 1	tipo 1	sí	37	45	0,82	tipo 1	tipo 1	sí
paciente 4	22	17	1,29	tipo 1	tipo 1	sí	24	17	1,41	tipo 1	tipo 1	sí
pacientes	33	22	1,50	tipo 1	tipo 1	sí	17	22	0,77	tipo 1	tipo 1	sí
paciente 6	11	23	0,48	tipo 2	tipo 2	sí	17	23	0,74	tipo 1	tipo 2	non
paciente 7	20	40	0,50	tipo 2	tipo 2	sí	19	40	0,48	tipo 2	tipo 2	sí
paciente 8	16	27	0,59	tipo 2	tipo 2	sí	24	27	0,89	tipo 1	tipo 2	no
paciente 9	1	5	0,20	AcvWF	AcvWF	sí	0	5	0,00	AcvWF	AcvWF	sí
correlación	100%						78,0%					

El principal interés de la medición del enlace del factor Willebrand al colágeno VWF:CB (Von WillebrandFactor:CollagenBinding), por oposición a la medición de su enlace a Gplb después de la activación por la ristocetina, reside en el hecho de que esta determinación es muy sensible a la pérdida de los multímeros de alto peso molecular, elementos que determinan la actividad del factor Willebrand. Permite entonces discriminar unos pacientes de tipo 2 y en particular los sub-tipos 2A y 2M.

Un reciente estudio ha demostrado el interés de la utilización de la N-acetilcisteína (NAC) en el tratamiento del púrpura trombótico trombocitopénico (PPT) consecutivo a la adhesión de las plaquetas a unos multímeros de factor Willebrand de tamaños muy elevados (*Chen J et al., J Clin Invest. 2011 121(2):593-603*). Estos multímeros son la consecuencia de una deficiencia en la enzima de maduración del factor Willebrand, ADAMTS13 (*adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, member 13*). El tratamiento de un conjunto de plasmas por NAC conduce a la pérdida de los multímeros de alto pesos moleculares y está asociado a una disminución del enlace de Willebrand al colágeno.

**Ejemplo 6. Comparación del ensayo ELISA según la invención y de dos kits ELISA comerciales (a base de colágeno) en el marco de un estudio clínico multicéntrico**

Como se ha descrito anteriormente, uno de los usos de la presente invención consiste en la medición de la actividad de enlace del factor Willebrand al polipéptido según la invención mediante la técnica denominada ELISA. Con el fin de verificar este ensayo frente a kits ELISA a base de colágeno ya comercializados, se ha realizado un estudio clínico multicéntrico (6 centros; autorización 2012/58 - ID RCB nº 2012-A01537-36) que incluyen 121 pacientes. Los plasmas recogidos provienen de pacientes que se distribuyen de la siguiente manera:

- 31 sujetos control,
- 28 pacientes con deficiencia de tipo 1,
- 9 pacientes con deficiencia de tipo 3,
- 18 pacientes con deficiencia tipo 2A,
- 17 pacientes con deficiencia tipo 2B,
- 18 pacientes con deficiencia tipo 2M.

Los kits ELISA comerciales seleccionados para este estudio contienen colágeno de tipo I (TECHNOZYM® vWF:CBA ELISA Collagen type I; ref: 5450311; Technoclone GmbH), o bien colágeno de tipo III (ASSERACHROM® VWF:CB;

ref: 00239; Stago). La medición de la actividad de enlace al factor Willebrand para estos dos kits se ha realizado según las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

5 En lo que se refiere al ensayo ELISA a base del polipéptido según la invención, se ha realizado a una concentración final de 2 µg/ml del polipéptido que tiene la o de secuencia SEC 2 y la medición efectuada sobre unos plasmas diluidos al 1/400 siguiendo el protocolo descrito anteriormente. La gama estándar utilizada para la determinación de la actividad de enlace al factor Willebrand se ha obtenido a partir del plasma estándar del kit ASSERACHROM® VWF:CB.

10 Los resultados presentados en la tabla II muestran las medias y desviaciones estándar obtenidas para cada uno de los ensayos. Se ha observado una buena correlación entre los valores de actividad de los plasmas normales y patológicos obtenidos con el ensayo ELISA utilizando el polipéptido según la invención y los obtenidos con los kits comerciales.

15 Tabla II: Medición de la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno para cada uno de los ELISA en función del tipo de deficiencia.

	CBA Stago Coll type III	CBA Cryopep Coll type I	ELISA Polipéptido SEC 2 2 µg/mL
Pacientes (número)	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)
Control (31)	103 (22,1)	161 (40,7)	98,1 (28,1)
Tipo 1 (28)	23,9 (8,9)	22,2 (11,7)	19,7 (7,5)
Tipo 3 (9)	1 (0,3)	0,2 (0,4)	1,6 (2,1)
Tipo 2A (18)	15,0 (8,8)	10,0 (10,8)	16,9 (11,3)
Tipo 2B (17)	29,5 (17,1)	31,4 (26,6)	31,8 (19,5)
Tipo 2M (18)	21,8 (13,1)	15,9 (19,8)	22,5 (17,7)

Estos resultados refuerzan los datos que se refieren a la capacidad del polipéptido según la invención a:

- 20
- unir el factor Willebrand de manera equivalente a unos colágenos nativos,
  - discriminar unos pacientes portadores de una deficiencia en factor Willebrand con respecto a unos controles,
  - ser utilizado en un ensayo ELISA en sustitución de los colágenos nativos.

25 **Referencias**

Referencias de patente

30 WO2010034718  
 WO2007052067  
 EP 1 870 460  
 EP 2383338

Referencias no de patente

35 Flood VH, J Thromb Haemost. 16 de abril de 2012  
 Springer TA, J ThrombHaemost. Julio de 2011; 9 Suppl 1:130-43  
 Schneppenheim R, Thromb Res. 2011;128 Suppl 1:S3-7  
 40 Chen C y Raghunath M. Fibrogenesis Tissue Repair. 15 de diciembre de 2009; 2:7  
 Herr AB y Farndale RW, J Biol Chem. 24 de julio de 2009; 284(30):19781-5  
 Lisman T *et al.*, Blood. 1 de diciembre de 2006; 108(12): 3753-6  
 Xu H *et al.*, Matrix Biol. Enero de 2011; 30(1):16-26  
 Giudici C *et al.*, J Biol Chem. 11 de julio de 2008; 283(28):19551-60  
 Brondijk TH *et al.* ProcNatlAcadSci U S A. 3 de abril de 2012;109(14):5253-8  
 45 Verkleij *et al.*, Blood. 15 de mayo de 1998; 91(10): 3808-16  
 BonnefoyA *et al.* J ThrombHaemost. Octubre de 2006; 4(10):2151-61  
 Favalaro EJ, Thromb Haemost. Noviembre de 2010; 104(5):1009-21  
 Baronciani L *et al.* J Thromb Haemost. Septiembre de 2006; 4(9):2088-90  
 Heemskerk JWM *et al.* J Thromb Haemost. Abril de 2011; 9(4):856-8  
 50 Werkmeister J y Ramshaw J. Biomed Mater. Febrero de 2012; 7(1):012002  
 Chen J *et al.*, J Clin Invest.2011 121(2):593-603  
 Neddlemanet Wunsch, J Mol Biol 1970 48:443

**Listado de secuencias**

55 <110> NVH Medicinal



ES 2 621 326 T3

<120> Proteínas recombinantes derivadas del colágeno con actividad de enlace al factor Willebrand

<130> 364053D29804

5 <150> FR 1259996  
<151> 19 octubre de 2012

<160> 8

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 552

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada del colágeno

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(552)

<220>

25 <221> sig\_péptido

<222> (1)..(69)

<400> 1

atg atg agc ttc gtg cag aag ggg agc tgg ctg ctt ctc gct ctg ctt 48  
Met Met Ser Phe Val Gln Lys Gly Ser Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15

cat cct act att atc ctg gca cag ggg cgc ccc gga gct cct gga gag 96  
His Pro Thr Ile Ile Leu Ala Gln Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Glu  
20 25 30

aga gga ttg cct gga cct cca ggg ccc aga gga gct gct gga gaa cct 144  
Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Ala Ala Gly Glu Pro  
35 40 45

ggc aga gat ggc gtc cct gga gga cca gga atg agg ggc atg ccc gga 192  
Gly Arg Asp Gly Val Pro Gly Gly Pro Gly Met Arg Gly Met Pro Gly  
50 55 60

agc cca gga gga cca gga agc gat ggg aag cca ggg cct ccc gga agc 240  
Ser Pro Gly Gly Pro Gly Ser Asp Gly Lys Pro Gly Pro Pro Gly Ser  
65 70 75 80

cag gga gaa agc ggc aga cca gga cct cct gga gag aac gga ttc cct 288  
Gln Gly Glu Ser Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Phe Pro  
85 90 95

gga gaa agg ggg gat gca ggc gct cct ggg gca cca gga cct cgt ggc 336  
Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Arg Gly  
100 105 110

30 cag ccc ggg gtg atg gga ttc ccc ggg gat gcc ggg gca cct ggt gca 384

ES 2 621 326 T3

Gln	Pro	Gly	Val	Met	Gly	Phe	Pro	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	
		115					120					125				
cct	ggc	cca	cgt	ggg	cag	cct	gga	gtc	atg	ggg	ttc	cct	gga	cca	cct	432
Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Val	Met	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Pro	
		130				135					140					
ggc	cca	cca	ggc	cct	ccc	gga	cca	cct	gga	cct	cca	ggc	cct	cct	ggc	480
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	
		145			150					155					160	
cct	cct	gga	cct	cct	gga	cca	cct	gga	cct	cca	ggc	cca	aga	ggc	gac	528
Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Asp	
				165					170					175		
aag	gga	cct	cct	gga	cct	gga	tct									552
Lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Ser									
				180												

<210> 2  
 <211> 184  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia derivada del colágeno

10 <400> 2

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

ES 2 621 326 T3

130	135	140
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly		
145	150	155
Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Asp		
	165	170
		175
Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ser		
	180	

5 <210> 3  
 <211> 163  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia derivada del colágeno

15 <220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1)..(23)

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

20 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Pro Pro Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Pro Gly Ser

ES 2 621 326 T3

<210> 4  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia derivada del colágeno  
  
 10 <220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1)..(23)  
  
 <400> 4  
 15

Met	Met	Ser	Phe	Val	Gln	Lys	Gly	Ser	Trp	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15	
His	Pro	Thr	Ile	Ile	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Glu
			20					25					30		
Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Glu	Pro
		35					40					45			
Gly	Arg	Asp	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Met	Arg	Gly	Met	Pro	Gly
	50					55					60				
Ser	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Asp	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ser
65					70				75						80
Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Asn	Gly	Phe	Pro
				85					90					95	
Gly	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly
			100					105					110		
Gln	Pro	Gly	Val	Met	Gly	Phe	Pro	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala
		115					120					125			
Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Val	Met	Gly	Phe	Pro	Gly	Asp	Ala
	130					135					140				
Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Val	Met	Gly
145					150					155					160
Phe	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro
				165				170						175	
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro
			180				185						190		
Gly	Pro	Arg	Gly	Asp	Lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Ser			
		195					200					205			

20 <210> 5  
 <211> 226  
 <212> PRT





**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Willebrand en un paciente, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 5 a) Proporcionar un polipéptido seleccionado de entre:
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
  - 10 - el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
  - el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
  - 15 - un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-Z<sub>2</sub>-GPRGQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

- 20 Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
 K es un número entero comprendido entre 4 y 15;

b) Poner en contacto la muestra biológica, previamente extraída del paciente, con dicho polipéptido;

25 c) Medir el enlace del factor Willebrand presente en la muestra biológica del polipéptido de la etapa a) para medir la actividad de enlace del factor Willebrand al colágeno.

2. Procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Willebrand en un paciente según la reivindicación 1, caracterizado por que Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan independientemente un motivo peptídico de fórmula (GAA<sub>1</sub>AA<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>(GAA<sub>3</sub>AA<sub>4</sub>)<sub>n2</sub>(GAA<sub>5</sub>AA<sub>6</sub>)<sub>n3</sub>(GAA<sub>7</sub>AA<sub>8</sub>)<sub>n4</sub>, en el que, independientemente:

- AA<sub>1</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>5</sub> y AA<sub>7</sub> representan independientemente los aminoácidos D o A,
- AA<sub>2</sub>, AA<sub>4</sub>, AA<sub>6</sub> y AA<sub>8</sub> representan independientemente los aminoácidos A o P,
- 35 • n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> y n<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre 0, 1, 2, 3 o 4 y la suma n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>+n<sub>3</sub>+n<sub>4</sub> es igual a 2, 3 o 4.

3. Procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Willebrand en un paciente según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan el motivo peptídico GDAGAPGAP de la SEC ID nº 7.

4. Procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Willebrand según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende además la determinación de la cantidad de factor Willebrand presente en la muestra.

45 5. Procedimiento de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polipéptido de la etapa a) se fija sobre un soporte sólido.

50 6. Procedimiento de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que las etapas b) y c) se realizan en condiciones de flujo.

7. Polipéptido, caracterizado por que se selecciona de entre:

- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 2,
- 55 - el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 184 de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 4,
- 60 - el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 205 de la SEC ID nº 4,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID nº 5,
- el polipéptido que comprende la secuencia de la posición 24 a la posición 226 de la SEC ID nº 5,
- 65 - un polipéptido que se une al factor Willebrand y que comprende el motivo peptídico Z<sub>1</sub>-GPRGQPGVMGFP-

Z<sub>2</sub>-GPR-GQPGVMGFP y el motivo peptídico (GPP)<sub>k</sub>

en los que, independientemente

5

Z<sub>1</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
Z<sub>2</sub> representa un enlazador que comprende de 6 a 12 aminoácidos,  
k es un número entero comprendido entre 4 y 15.

10

8. Kit para determinar la actividad de enlace del factor Willebran al colágeno, caracterizado por que comprende:

- a) un polipéptido según la reivindicación 7;
- b) un reactivo de detección para determinar el enlace del factor Willebrand al colágeno.

15

9. Kit según la reivindicación 8, caracterizado por que comprende un anticuerpo que se une al factor Willebrand.



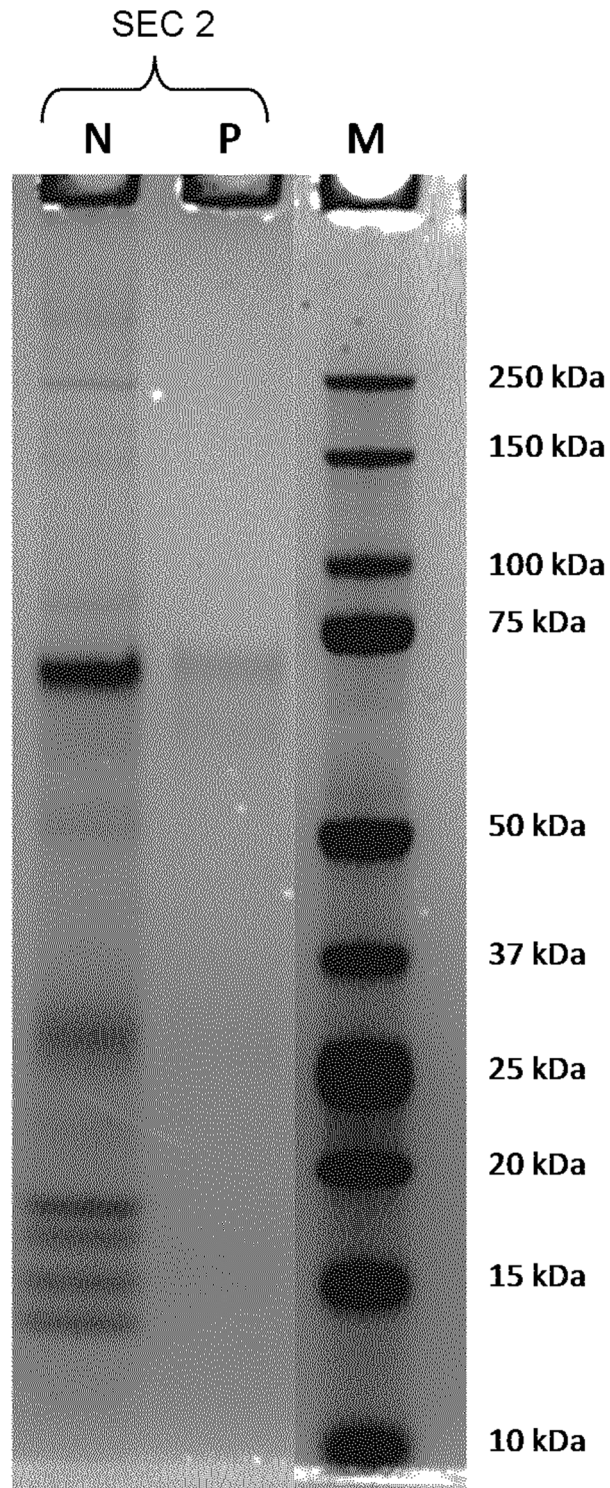


Fig.1

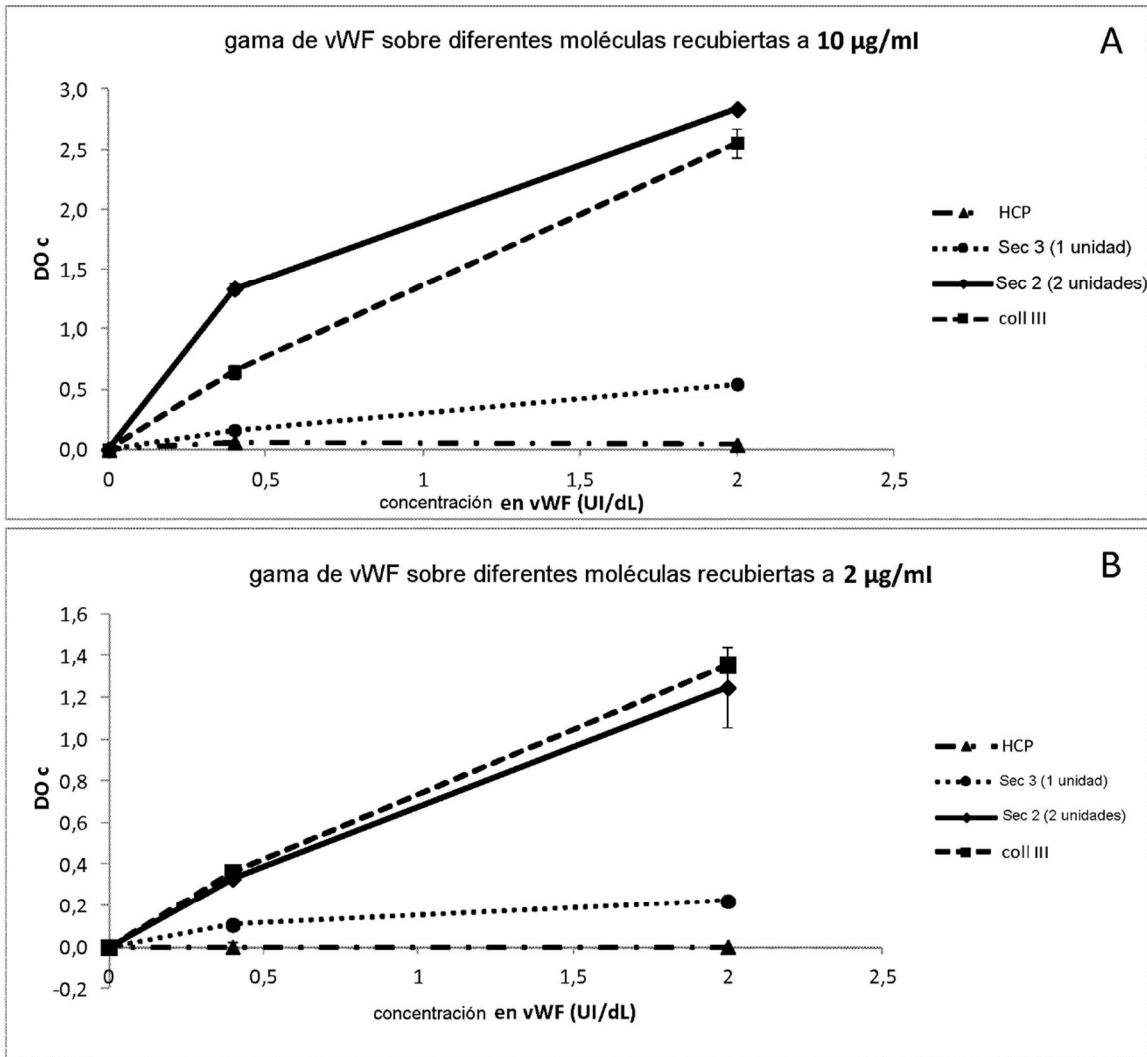


Fig.2

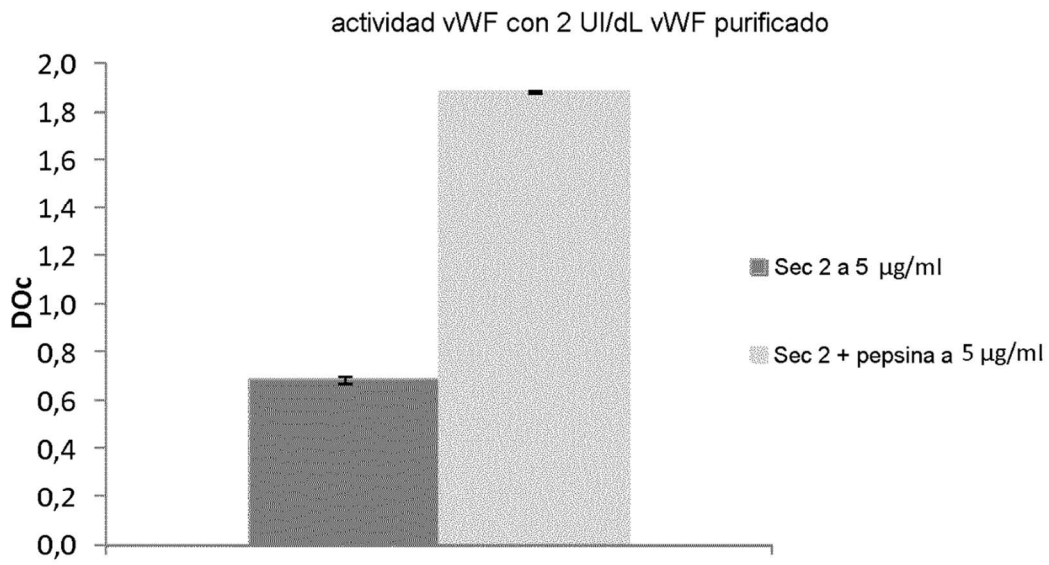


Fig.3

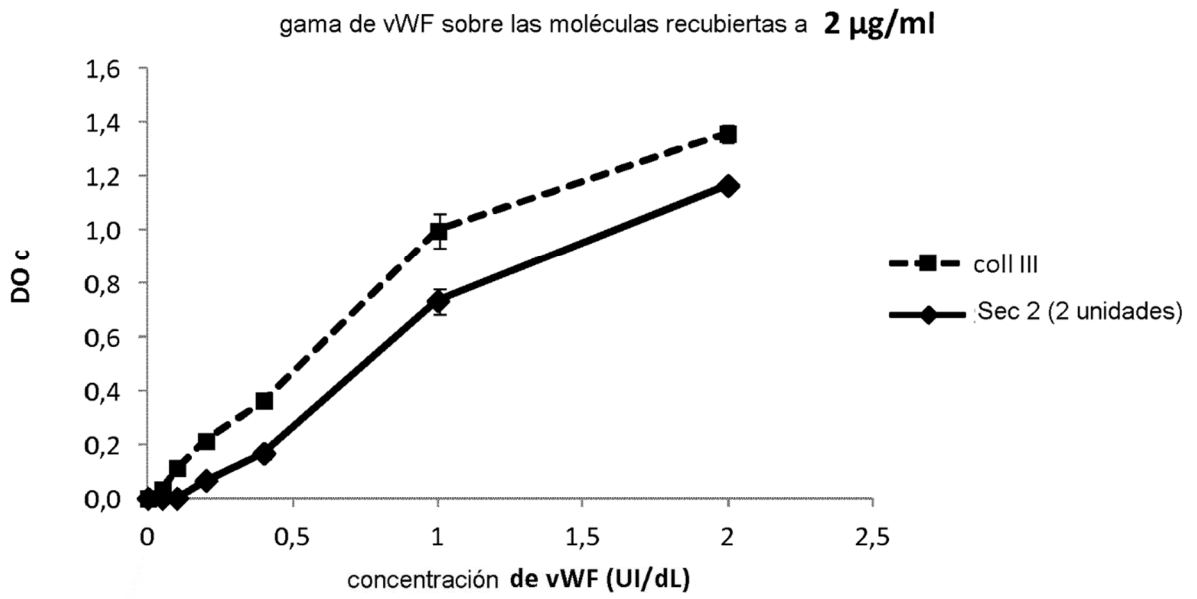


Fig.4

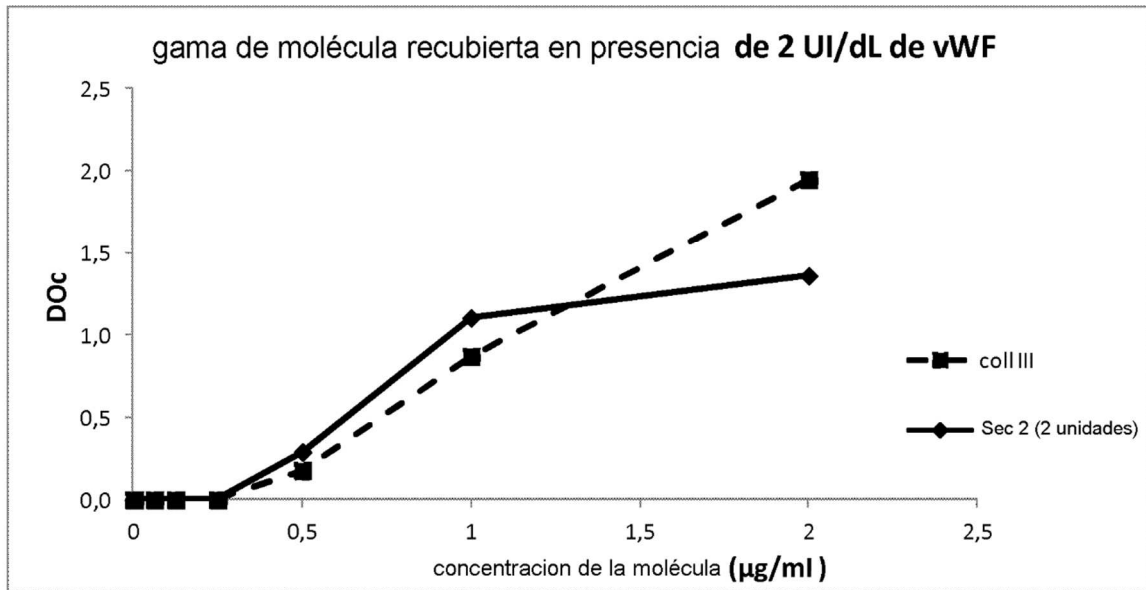


Fig. 5

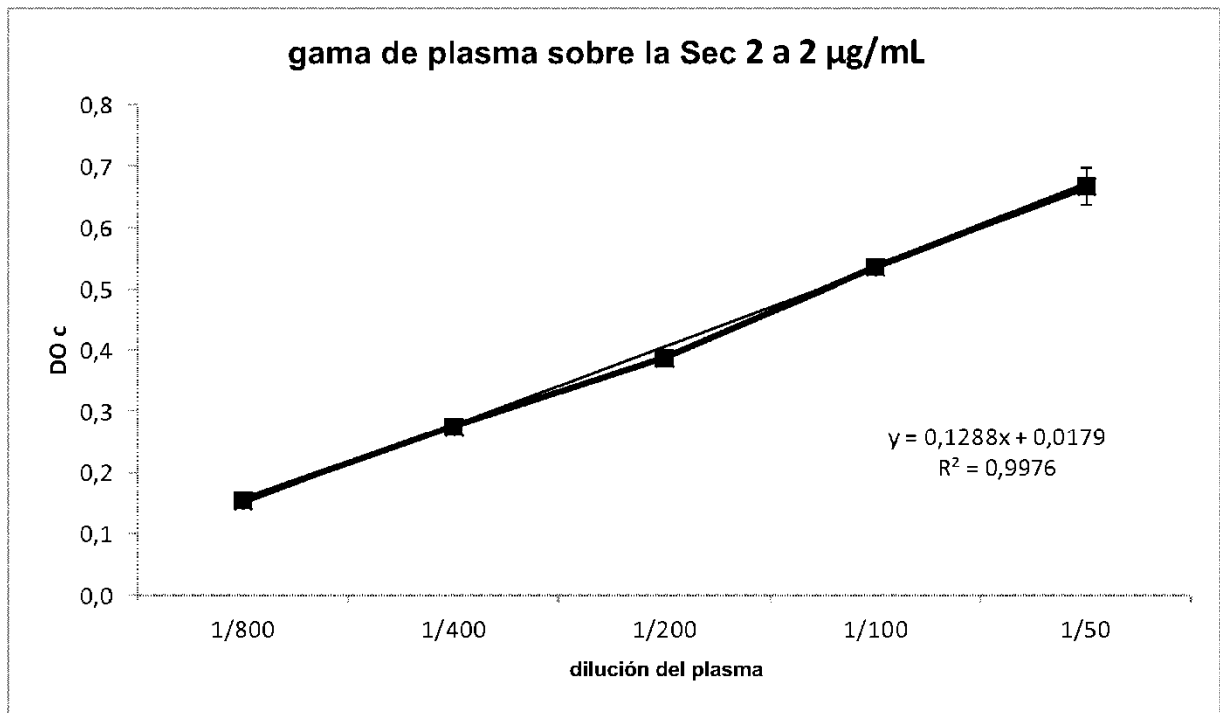


Fig.6