

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 503**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/573** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**C12Q 1/56** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2009 PCT/US2009/066588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09764426 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2358895**

54 Título: **Métodos de medida de la división in vivo de Factor von Willebrand mediada por ADAMTS13 y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

**05.12.2008 US 120202 P**

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

**09.10.2018**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**

**Zaehlerweg 4**

**6300 Zug, CH y**

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VARADI, KATALIN;**

**ROTTENSTEINER, HANSPETER;**

**TURECEK, PETER;**

**SCHWARZ, HANS-PETER y**

**SCHREINER, JUTTA**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 685 503 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

**Métodos de medida de la división *in vivo* de Factor von Willebrand mediada por ADAMTS13 y utilización de los mismos**

## SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. con nº de serie 61/120.202, presentada el 5 de diciembre de 2008.

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 La invención se refiere a métodos para estudiar la eficacia de un Factor von Willebrand (FvW) utilizado en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EvW) en un sujeto, comprendiendo la medida de fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre del sujeto antes y después del tratamiento tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 El factor von Willebrand (FvW) circulante en humanos sanos está compuesto por una serie de multímeros de alto peso molecular, en el intervalo de aproximadamente 450.000 a aproximadamente 20 millones de daltons (Da) o incluso un peso molecular mayor, tras la liberación desde reservas (pools) de almacenamiento. El FvW media en la hemostasia primaria favoreciendo la adhesión plaquetaria en vasos sanguíneos dañados. Además de necesario para la agregación plaquetaria, el FvW es imprescindible para la estabilización del factor VIII (FVIII) circulante. En la enfermedad de von Willebrand (EvW), se reduce al menos una de estas funciones del FvW, provocando síntomas clínicos de diversa gravedad (REITER RA et al.: BLOOD, vol. 101, nº 3, 1 de febrero de 2003 (2003-02-01), páginas 946-948, describe cambios en la actividad de proteasa divisora de factor de von Willebrand (ADAMTS13) después de la infusión de desmopresina). Haberichter SL et al.: HEMOSTASIS, BLOOD, vol. 108, nº 10, 15 de febrero de 2006, páginas 3344-3351, describen un ensayo de FvW para identificar pacientes con EvW de tipo 1 con supervivencia reducida de FvW. Los autores no observaron una relación clara entre la división por ADAMTS13, una intensidad reducida de bandas satélite de FvW y el aumento de la eliminación de FvW.

- 25 El grado de multimerización del FvW juega un papel importante en la función hemostática primaria y se relaciona con la capacidad de favorecer la agregación plaquetaria. La falta de formas multiméricas altas de FvW conduce a una disminución de la agregación plaquetaria, como se observa en individuos con EvW de tipo II. Por otro lado, la acumulación de multímeros de FvW ultragrandes puede provocar trombosis en la microvasculatura. En individuos sanos, el tamaño multimérico del FvW es regulado por la presencia de ADAMTS13. Debido a la división por ADAMTS13 de los monómeros de FvW entre Tyr<sup>1605</sup> y Met<sup>1606</sup>, el patrón de multímeros de FvW muestra una estructura "tripleto" característica. Los individuos carentes de ADAMTS13 tienen una mayor proporción de multímeros de FvW ultragrandes y una menor estructura tripleto. Con frecuencia, estos individuos desarrollan el síndrome denominado púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), que se caracteriza por la formación de trombos en la microvasculatura con consumo de plaquetas.

- 35 La ADAMTS13 solo puede dividir el FvW cuando su conformación cambia de una forma globular a una forma extendida, un cambio que normalmente solo se produce bajo tensión de cizalladura. La actividad de la ADAMTS13 normalmente se mide *in vitro* bajo condiciones desnaturalizantes para inducir el cambio de conformación o utilizando un sustrato peptídico.

- 40 Actualmente no se dispone de un método para examinar la actividad *in vivo* de la ADAMTS13 en presencia de FvW endógeno. Por tanto, en la técnica existe una necesidad de desarrollar nuevos métodos de medida de la división de FvW por ADAMTS13. En la técnica también sigue siendo necesario determinar la eficacia de nuevos productos de FvW recombinante y ADAMTS13 durante estudios preclínicos y clínicos. Además, en la técnica existe una necesidad de nuevos métodos para examinar la eficacia de nuevas terapias en el tratamiento de deficiencias de ADAMTS13 *in vivo*.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- 45 La invención aborda una o más necesidades en la técnica relacionadas con los métodos de medida de la actividad *in vivo* de la ADAMTS13 y de evaluación de nuevos tipos de factor de von Willebrand (FvW) recombinante *in vivo* para su administración subsiguiente a un sujeto que lo necesite.

- 50 En un aspecto, la invención incluye métodos para detectar fragmentos de FvW en la sangre de un sujeto de acuerdo con las reivindicaciones. Estos métodos muestran la actividad *in vivo* de la ADAMTS13 mediante detección (es decir, visualización e incluso cuantificación) de la cantidad de fragmentos circulantes de FvW dividido. En un aspecto, los métodos se basan en SDS-PAGE en combinación con inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos contra

FvW, tal como se define en las reivindicaciones. En algunos aspectos, los anticuerpos de FvW son específicos para diferentes fragmentos de FvW. Estos anticuerpos son policlonales o monoclonales. En otros aspectos, una muestra de sangre de un sujeto se aplica a un gel, el gel se somete a inmunotransferencia con un anticuerpo de FvW conjugado con un marcador y el marcador se detecta con quimioluminiscencia aumentada, tal como se define en las reivindicaciones.

También se describen aquí métodos para determinar actividad aberrante de la ADAMTS13 *in vivo*, que comprenden la etapa de medir fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre de un sujeto de ensayo, indicando un cambio en los niveles de fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre del sujeto de ensayo, en comparación con los niveles de fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre de un individuo de control con una actividad de ADAMTS13 normal, una actividad aberrante de la ADAMTS13 *in vivo* en el sujeto de ensayo, siendo generados los fragmentos de división de FvW por la actividad de la ADAMTS13 y siendo llevada a cabo la división de FvW bajo tensión de cizalladura.

Además se describen aquí métodos para medir la actividad de la ADAMTS13 en una muestra de sangre de un sujeto que comprenden las etapas de: medir fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre después de haberla expuesto a tensión de cizalladura; comparar los fragmentos de división de FvW con una curva de referencia de FvW completamente degradado; y cuantificar los fragmentos de división de FvW en base a la curva de referencia, estando la cantidad de fragmentos de división de FvW en correlación con la cantidad de actividad de la ADAMTS13, y siendo generados los fragmentos de división de FvW por la actividad de la ADAMTS13, o comprendiendo las etapas de:

- a) añadir factor de von Willebrand (FvW) a una muestra de sangre del sujeto;
- b) medir fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre después de exponer la muestra en presencia y ausencia de tensión de cizalladura;
- c) comparar los fragmentos de división de FvW con una curva de referencia de FvW completamente degradado o con una curva de referencia de un plasma humano o animal diluido; y
- d) cuantificar los fragmentos de división de FvW en base a la curva de referencia, estando la cantidad de fragmentos de división de FvW en correlación con la cantidad de actividad de la ADAMTS13, y siendo generados los fragmentos de división de FvW por la actividad de la ADAMTS13,

o que comprenden la etapa siguiente:

- a) comparar el nivel de FvW total y de fragmentos de división de FvW de una muestra de sangre del sujeto con una curva de referencia de FvW degradado de forma creciente o completamente degradado, incluyendo la determinación del nivel de fragmentos de división de FvW la etapa de exponer la muestra de sangre a tensión de cizalladura, y siendo generados los fragmentos de división de FvW por la actividad de la ADAMTS13.

La descripción también incluye métodos para estudiar la eficacia de un tratamiento para aumentar la actividad o la concentración de ADAMTS13 en un individuo tal como se define en las reivindicaciones, que comprenden medir fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre del individuo antes y después del tratamiento, indicando un aumento de los fragmentos de división de FvW después del tratamiento que el tratamiento es eficaz para aumentar la actividad o la concentración de la ADAMTS13 en el individuo.

La invención se refiere a métodos para valorar la eficacia de un factor von Willebrand (FvW) utilizado en el tratamiento de la EvW en un individuo, que comprenden medir fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre del individuo antes y después del tratamiento, indicando un aumento de los fragmentos de división de FvW después del tratamiento que la ADAMTS13 endógena en el individuo está dividiendo el FvW, e indicando una disminución o una ausencia de los fragmentos de división de FvW después del tratamiento que la ADAMTS13 endógena no está dividiendo el FvW y siendo generados los fragmentos de división de FvW por la actividad de la ADAMTS13, y siendo llevada a cabo la división de FvW bajo tensión de cizalladura.

Se describe aquí que el individuo puede padecer una EvW asociada a una deficiencia o disfunción de la ADAMTS13. En diversos aspectos, los métodos de la invención permiten comparar la interacción especie-especie de diversas fuentes de FvW y ADAMTS13 de diferentes especies o modelos animales.

También se describe aquí que en los métodos descritos el tratamiento puede ser la administración de ADAMTS13 al individuo.

Además, en los métodos tal como se describen aquí, el individuo puede padecer púrpura trombocitopénica trombótica (PTT).

En diversos aspectos de la invención, la medida de fragmentos de división de FvW o del nivel de FvW comprende realizar análisis por transferencia Western con un anticuerpo de FvW para visualizar los fragmentos de división de FvW. En un aspecto, el análisis por transferencia Western se lleva a cabo bajo condiciones no reductoras para aumentar la

sensibilidad. En otros aspectos también se utilizan condiciones reductoras. En otros aspectos de los métodos de la invención, los fragmentos de FvW se visualizan empleando un anticuerpo de FvW conjugado con un marcador. En diversos aspectos, el marcador es fosfatasa alcalina (FA) o peroxidasa de rábano (PR). En otros aspectos adicionales, el marcador se detecta con quimioluminiscencia aumentada (QA).

5 En algunos aspectos de la invención, los multímeros de FvW se visualizan utilizando electroforesis en gel de agarosa-SDS horizontal de alta resolución, seguida por inmunotinción con un anticuerpo de FvW antihumano de conejo policlonal. En otros diversos aspectos de la invención, el anticuerpo de FvW es monoclonal o policlonal. También se considera en los métodos de la invención el uso de otros tipos de anticuerpos conocidos en la técnica. En otros aspectos adicionales, el nivel de fragmentos de división de FvW se detecta a un nivel de sensibilidad de  
10 aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,5 Ag U/ml de FvW.

También se describen aquí métodos para evaluar la actividad de ADAMTS13 en un individuo, que consisten en comparar el nivel de FvW total y de fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre del individuo con una curva de referencia de FvW degradado de forma creciente o digerido, estando el nivel de fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre en correlación con la actividad de la ADAMTS13 deducida a partir de la curva de referencia tal como se define en las reivindicaciones.  
15

En diversos aspectos, el nivel de fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre del individuo de ensayo es mayor en comparación con el nivel de fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre de un individuo de control, lo que indica una mayor actividad de ADAMTS13 *in vivo* en el individuo de ensayo en comparación con el individuo de control. En otros aspectos, el nivel de fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre del individuo de ensayo es menor en comparación con el nivel de fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre de un individuo de control, lo que indica una menor actividad de la ADAMTS13 *in vivo* en el individuo de ensayo en comparación con el individuo de control.  
20

En algunos aspectos, el cambio en el nivel de fragmentos de división de FvW se detecta midiendo el nivel de uno o más fragmentos de FvW. En algunos aspectos, el fragmento de FvW medido es un fragmento de FvW de 140 kDa o un fragmento de FvW de 176 kDa. En aspectos particulares, el fragmento de FvW medido es un fragmento de FvW de 176 kDa.  
25

Además, se describen aquí métodos para medir la actividad de ADAMTS13 en un individuo, que comprenden las etapas de: añadir FvW a una muestra de sangre de un individuo; medir fragmentos de división de FvW en la muestra de sangre después de exponerla en presencia y en ausencia de tensión de cizalladura; comparar los fragmentos de división de FvW con una curva de referencia de FvW completamente degradado o con una curva de referencia de plasma humano o animal diluido; y cuantificar los fragmentos de división de FvW en base a la curva de referencia, estando la cantidad de fragmentos de división de FvW en correlación con la cantidad de actividad de la ADAMTS13 en la muestra. En un aspecto, el FvW es un FvW recombinante (FvWr) intacto que todavía no ha sido dividido por ADAMTS13. En algunos aspectos, la tensión de cizalladura comprende una velocidad de cizalladura de aproximadamente  $100 \text{ s}^{-1}$  a aproximadamente  $10.000 \text{ s}^{-1}$ , a una temperatura de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $40^\circ\text{C}$ , durante un período de tiempo. En otros aspectos, la velocidad de cizalladura es de aproximadamente  $1.000 \text{ s}^{-1}$  a aproximadamente  $8.000 \text{ s}^{-1}$ . En un aspecto, la velocidad de cizalladura es de aproximadamente  $6.000 \text{ s}^{-1}$ . En diversos aspectos, la temperatura es de aproximadamente  $30^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $40^\circ\text{C}$ . En un aspecto, la temperatura es de aproximadamente  $37^\circ\text{C}$ . En algunos aspectos, el período de tiempo oscila entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 1 hora. En otros aspectos, el tiempo oscila entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 30 minutos. En un aspecto, el tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En otro aspecto, el tiempo es de aproximadamente 15 minutos.  
30  
35  
40

En diversos aspectos, la muestra de sangre en los métodos de la invención es plasma o suero. En aspectos particulares, la muestra de sangre es plasma. En otros aspectos, la muestra de sangre es suero. En otros aspectos, la muestra de sangre es plasma que también contiene componentes celulares, como plaquetas y glóbulos blancos.  
45

En otros aspectos, el individuo en los métodos de la invención es un mamífero. En algunos aspectos, el individuo mamífero es un humano, un conejo, un mono, un perro, una rata, un ratón o un cerdo. En otros aspectos, el individuo mamífero es un humano, un conejo, un mono o un perro. En un aspecto particular, el individuo es un humano.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 La invención se ilustra adicionalmente en referencia a las figuras adjuntas, que se muestran más abajo como Figuras 1-18.

Figura 1: muestra los cambios en la estructura multimérica del FvWr después de su división por ADAMTS13 humana.

- Figura 2: muestra la división específica de monómeros de FvWr por ADAMTS13 según detección por inmunotransferencia con anticuerpos de FvW.
- Figura 3: muestra la división dependiente de ADAMTS13 de FvWr detectada mediante ensayo de FvW:AUC residual.
- 5 Figura 4: muestra la actividad de la ADAMTS13, expresada como porcentaje de plasma humano normal (PHN), según se mide con ensayos FRETs y FvW:AUC.
- Figura 5: ilustra la división de FvW por ADAMTS13 utilizando análisis de multímeros de alta resolución y demuestra que el plasma de conejo induce la degradación del FvWr y la formación de bandas satélite similares a las del plasma humano.
- 10 Figura 6: muestra los resultados de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras seguida de inmunotransferencia con anticuerpo de FvW antihumano policlonal unido con PR después de incubar FvWr con plasma de varias especies de animales. Los resultados indican la división de FvWr humano después de la incubación con plasma de humano, conejo, mono, cerdo o perro, pero no con plasma de cobaya, rata o ratón.
- 15 Figura 7: muestra los resultados de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras seguida de inmunotransferencia con anticuerpos de FvW monoclonales. El asterisco indica reacciones del anticuerpo de IgG antiratón de cabra (secundario) con IgG de plasma de ratón endógenas.
- Figura 8: muestra la división *in vivo* específica de FvWr (1200 UI FvW:CoR/kg) por ADAMTS13 (fragmentos de 140 kDa y 176 kDa) en conejos. Se detectaron fragmentos de FvW con anticuerpos monoclonales mediante inmunotransferencia con SDS-PAGE reductora (Figuras 8A y B). Como controles se muestran FvWr no dividido y FvWr dividido con ADAMTS13r *in vitro*. También se ven cambios característicos en el patrón de multímeros poco después de la administración de FvWr (Figura 8C).
- 20 Figura 9: muestra la división *in vivo* específica de FvWr (2000 UI FvW:CoR/kg) por ADAMTS13 en ratones con deficiencia de FvW y deficiencia de ADAMTS13. El fragmento de división de 176 kDa no era visible en ninguna de las dos cepas de ratones utilizando el anticuerpo monoclonal específico para el fragmento C-terminal (Figura 9A). El asterisco indica reacciones del anticuerpo de IgG antiratón de cabra con IgG de plasma de ratón. No se observó ningún cambio detectable en el patrón de multímeros de FvWr (Figura 9B). Los homodímeros de 140 kDa y 176 kDa solo eran detectables en ratones con deficiencia de FvW, pero no en ratones con deficiencia de ADAMTS13, utilizando el anticuerpo policlonal más sensible (pero menos específico) bajo condiciones no reductoras (Figura 9C).
- 25 Figura 10: muestra una comparación directa de la eficiencia de división por ADAMTS13 en diversos modelos animales utilizando SDS-PAGE no reductora después de cargar cantidades iguales de FvW:Ag. En muestras de plasma de conejo era detectable una banda más fuerte correspondiente al producto de división de FvW de 176 kDa en comparación con la muestra de ratón con deficiencia de FvW. En el plasma de ratón con deficiencia de ADAMTS13 no era detectable ninguna división. La coinyección de FvWr con ADAMTS13r humana indujo la división del FvWr.
- 30 Figura 11: muestra los resultados de la detección por transferencia Western de fragmentos de división de FvW en plasma de *Cynomolgus* después de una inyección de dosis única de FvWr (100 UI/kg). Se midieron fragmentos de FvWr (1 Ag U/ml) completa y parcialmente degradado por ADAMTS13 en plasma de *Cynomolgus* después de una inyección de dosis única de FvWr después de 15 segundos de exposición (Figura 11A) con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo. La intensidad de una banda dimérica de 176 kDa aumentó después de la inyección de FvWr. El dímero de FvW de 176 kDa era mayor que la base de referencia (antes de la inyección) incluso 24 horas después de la inyección de FvW (Figura 11A), cuando no se midió antígeno de FvW elevado (FvW:Ag) (Figura 11B).
- 35 40 Figura 12: muestra FvWr completa y parcialmente degradado por ADAMTS13 (1 Ag U/ml) medido en tampón y en plasma con deficiencia de FvW por transferencia Western bajo condiciones no reductoras después de 15 segundos de exposición con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo policlonal. Las condiciones reductoras no eran lo suficientemente sensibles para visualizar resultados. No se detectó ninguna diferencia entre diluciones en tampón (Figura 12A) y en plasma con deficiencia de FvW (Figura 12B).
- 45 Figura 13: muestra que se detectaron fragmentos de división de FvW en plasma aumentando la sensibilidad del ensayo mediante el aumento del tiempo de exposición. Se midió FvWr completa y parcialmente degradado por ADAMTS13 (1 Ag U/ml) en tampón y en plasma con deficiencia de FvW con transferencia Western bajo condiciones no reductoras después de 15 segundos (Figura 13A) y 60 segundos (Figura 13B) de exposición con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo.
- 50 Figura 14: muestra resultados de optimización de la sensibilidad del análisis por transferencia Western llevando a cabo diluciones de muestras y aumentando los tiempos de exposición de transferencia. Un plasma humano normal se

diluyó a un factor 20 y, después de un tiempo de exposición de dos minutos en 20-40 nl de plasma humano normal (Figura 14A), se detectó perfectamente un producto de división de 176 kDa. En el plasma con deficiencia de FvW no se pudo ver ninguna banda específica de la ADAMTS13 (producto de división de FvW) (Figura 14A). Un FvWr completamente degradado (1 Ag U/ml) se diluyó en un factor 40 (0,5 nl a 20 nl) y se pudo detectar en un nivel de sensibilidad de aproximadamente 0,0006 U/ml (0,5 nl/0,8 µl de plasma) (Figura 14B).

Figura 15: muestra la cuantificación de la división de FvW por ADAMTS13 en plasma. Un producto de división de FvW de 176 kDa se detectó perfectamente en plasma humano normal (aproximadamente 0,025 Ag U/ml de FvW) (Figura 15A). En plasma humano normal se encontró aproximadamente un 1-2% de dímeros C-terminales (el producto de división específica por ADAMTS13 de 176 kDa) cuando se calculó a partir de una curva de referencia (Figura 15B) construida a partir de la intensidad de banda de diferentes cantidades de FvWr completamente degradado (1 Ag U/ml).

Figura 16: muestra los resultados de la detección por transferencia Western del fragmento de división de FvW C-terminal en plasma humano después de la administración de 7,5 (Figura 16A) y 20 (Figura 16B) UI de FvW:CoR/kg a individuos en un ensayo clínico en fase I. El fragmento de FvWr dependiente de ADAMTS13 era detectable en plasma con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo ya 15 minutos después del tratamiento. La intensidad de la banda dimérica de 176 kDa permaneció por encima del fondo durante aproximadamente 1 hora (7,5 UI FvWr) y 32 horas (20 UI FvWr).

Figura 17: muestra los resultados de detección por transferencia Western del fragmento de división de FvW C-terminal después de división *in vitro* de 1 UI/ml de FvWr mediante 0,2 U/ml de ADAMTS13 recombinante humana, ADAMTS13 derivada de plasma humano, y plasma humano normal en presencia y en ausencia de tensión de cizalladura.

Figura 18: muestra los cambios en la estructura multimérica de FvWr a baja (Figura 18A) y alta (Figura 18B) resolución después de división *in vivo* por ADAMTS13 humana en presencia y en ausencia de tensión de cizalladura.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen aquí métodos para medir la actividad de ADAMTS13 midiendo la división *in vivo* de FvW o FvWr por ADAMTS13. La invención proporciona métodos para determinar si el FvW se procesa normalmente tal como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas. La invención aborda una necesidad existente en la técnica de métodos mejorados para examinar la eficacia de nuevas terapias en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EvW). También se describe aquí el tratamiento de la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y de otras afecciones asociadas a niveles aberrantes de ADAMTS13.

A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto medio en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2ª ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5ª ED., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

Se ha de señalar que, tal como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a no ser que el contexto determine claramente lo contrario.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos a no ser que se especifique lo contrario.

También se entiende específicamente que cualquier valor numérico aquí indicado incluye todos los valores desde el valor inferior hasta el valor superior, es decir, todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto deben ser consideradas como expresamente indicadas en esta solicitud. Por ejemplo, si se indica un intervalo de concentraciones de aproximadamente el 1% al 50%, se considera que valores tales como del 2% al 40%, del 10% al 30%, o del 1% al 3%, etc. están expresamente citados en esta especificación. Los valores arriba indicados son únicamente ejemplos de lo que específicamente se pretende.

Los intervalos se pueden expresar aquí como desde "alrededor de" o "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "alrededor de" o "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se indica un intervalo de este tipo, otra realización incluye desde el primer valor particular y/o hasta el otro valor particular. De modo similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización.

El término "aberrante" se refiere a un nivel o una actividad anormales, atípicos o poco naturales de un polipéptido, proteína o enzima en un individuo de ensayo en comparación con el nivel o la actividad del polipéptido, proteína o enzima en un individuo normal o de control. Este nivel o esta actividad anormales pueden reflejar un nivel más bajo, una actividad menor o una deficiencia completa.

5 La expresión "fragmento de división de FvW" o "fragmentos de FvW" o "productos de división de FvW" se utilizan aquí indistintamente y se refieren a fragmentos de FvW que resultan de la división por proteasa, siendo ADAMTS13 la proteasa que divide el FvW. La ADAMTS13, también denominada proteasa divisora de FvW (PDFvW), es una enzima metaloproteasa con contenido en zinc que divide el FvW. La ADAMTS13 es segregada en la sangre y degrada grandes multímeros de FvW, disminuyendo su actividad. La ADAMTS13 consiste en múltiples dominios estructurales y  
10 funcionales y estos dominios pueden participar en el reconocimiento y la unión de ADAMTS13 a FvW. Las expresiones "multímeros" y "formas multiméricas" se utilizan aquí indistintamente. Los multímeros de FvWUL son divididos por ADAMTS13 cuando son segregados desde células endoteliales. Por tanto, los términos "ADAMTS13" y "PDFvW" se utilizan indistintamente.

15 Los términos "visualizado" y "detectado" se utilizan aquí indistintamente cuando se habla del examen de nivel(es) de fragmentos de división de FvW en inmunotransferencias o transferencias Western. De modo similar, los términos "nivel" y "niveles" se refieren a la cantidad o la concentración de FvW visualizado, detectado o medido en una transferencia o ensayo.

20 Las expresiones "individuo" o "individuo de ensayo" o "individuo que lo necesita" se pueden utilizar aquí indistintamente y se refieren a cualquier mamífero. En diversos aspectos, el individuo es un humano, un conejo, un mono o un perro. Se sabe que, como los humanos, los perros padecen EvW.

Las expresiones "sangre" o "muestra de sangre" se pueden utilizar aquí indistintamente. En diversos aspectos, la sangre es plasma o suero. Por tanto, las expresiones "sangre", "muestra de sangre", "plasma", "muestra de plasma", "suero" y "muestra de suero" se utilizan aquí indistintamente.

25 El término "endógeno" se refiere a un polipéptido o polinucleótido u otro compuesto que es expresado de forma natural en un organismo huésped, o que se produce dentro de una célula, tejido u órgano. "Exógeno" se refiere a un polipéptido, polinucleótido u otro compuesto que se produce fuera de una célula, tejido u órgano fuera de un organismo huésped.

30 El término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por un residuo aminoácido unido por enlaces peptídicos. Los polímeros sintéticos se sintetizan, por ejemplo, completamente o en parte, utilizando un sintetizador de polipéptidos automático. El término "proteína" se refiere normalmente a polipéptidos grandes. El término "péptido" se refiere normalmente a polipéptidos cortos.

Las expresiones "ADAMTS13" o "ADAMTS13 recombinante" o "ADAMTS13r" se pueden utilizar aquí indistintamente y se refieren a una desintegrina y metaloproteínasa con un motivo trombospondina de tipo 1, polipéptido miembro 13.

35 Las expresiones "FvW" o "FvW recombinante" o "FvWr" se pueden utilizar aquí indistintamente y se refieren al polipéptido factor von Willebrand.

Los términos "agente" o "compuesto" describen cualquier molécula con capacidad para afectar a un parámetro biológico en el individuo mamífero de la invención.

40 Los métodos de la invención incluyen el uso de diversos ensayos para medir la actividad de ADAMTS13. En algunos aspectos, la división de FvWr por ADAMTS13 se lleva a cabo de acuerdo con la descripción de Gerritsen et al. (Thromb. Haemost. 82: 1386-1389, 1999) con modificaciones de poca importancia. El FvW recombinante es digerido con ADAMTS13 activado con Ba<sup>2+</sup> bajo condiciones desnaturalizantes. Las muestras de plasma se diluyen 1:20 en Tris 5 mM, urea 1,5 M, pH 8,0 (50 mU/ml actividad de la ADAMTS13), se mezclan con BaCl<sub>2</sub> 9,3 mM para activar la ADAMTS13 y 1 UI/ml de FvWr humano (concentración final), y se incuban a 37°C durante 24 horas. Las reacciones se  
45 detienen añadiendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8,25 mM). La solución se centrifuga y el sobrenadante resultante se utiliza para análisis posteriores. Como control positivo, 1 UI/ml de FvWr se incubaba con ADAMTS13r humana (50 mU/ml) bajo condiciones que por lo demás son idénticas a las utilizadas para el elemento de ensayo.

En otros aspectos de la invención, se determina el antígeno de FvW en muestras de plasma. El FvW:Ag se determinó con ELISA utilizando anticuerpos anti-FvW de conejo policlonales comerciales (Dako, Glostrup, Dinamarca) de acuerdo con la descripción de Tan et al. (Thromb. Res. 121: 519-526, 2008).

50 En otro aspecto de la invención, la actividad de la ADAMTS13 se mide utilizando un péptido de FvW sintético con marcado fluorescente compuesto por 73 aminoácidos (FRETTS-VWF73, Peptides Institute, Osaka, Japón) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma se miden contra una curva de referencia de plasma humano normal diluido.

5 En otros aspectos más de la invención, se lleva a cabo una determinación de la actividad de unión de colágeno (FvW:AUC). En algunos aspectos, la unión de FvWr a colágeno se determina de acuerdo con un método basado en ELISA publicado (Turecek et al., Semin. Thromb. Hemost. 28: 149-160, 2002). En algunos aspectos, la fuente de colágeno es colágeno humano de tipo III de Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). El FvWr unido se detecta con anticuerpo anti-FvW policlonal conjugado con PR (Dako).

10 En otro aspecto más de la invención, se lleva a cabo un análisis de multímeros de FvW. En algunos aspectos, la estructura multimérica del FvWr se analiza por electroforesis en gel de agarosa-SDS horizontal de alta densidad, de acuerdo con la descripción de Turecek et al. (Blood 90: 3555-3567, 1997). Las muestras se diluyen a 1,0 UI/ml FvW:Ag y se incuban con tampón Tris-EDTA-SDS. Los multímeros contenidos en la solución se separan bajo condiciones no reductoras en un gel de agarosa de alta resolución al 2,5%. Los multímeros de FvW se visualizan en el gel mediante inmunotinción con un anticuerpo de FvW antihumano de conejo policlonal (Dako), seguido por IgG anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina (FA) utilizando el *kit* de desarrollo de color FA de Bio-Rad (Richmond, CA, EE.UU.).

15 La invención también incluye el análisis de productos de división específica por ADAMTS13 tal como se define en las reivindicaciones. En algunos aspectos, la división mediada por ADAMTS13 se detecta por análisis SDS-PAGE y transferencia Western utilizando un anticuerpo de FvW antihumano policlonal (Dako) o, en algunos aspectos, uno de los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: VW33-5, dirigido contra el fragmento I de proteasa V8 del FvW (TaKaRa Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Francia); VW92-3, dirigido contra el fragmento III de proteasa V8 del FvW bajo condiciones no reductoras (TaKaRa Bio Europe); EsvWF10, que reconoce el dominio A1 del FvW bajo condiciones reductoras (American Diagnostica, Stamford, CA), y N10, que detecta el epítipo generado después de la división por ADAMTS13 en el fragmento N-terminal (Kato et al., Transfusion 46: 1444-1452, 2006). En algunos aspectos se utilizan anticuerpos con anticuerpos secundarios antirratón de cabra conjugados con FA y el *kit* de detección de FA (Bio-Rad).  
20 En otros aspectos, un anticuerpo anti-FvW de conejo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano (PR) (Dako) se utiliza con el sistema de detección por QA (GE Healthcare, Munich, Alemania) para evitar anticuerpos secundarios que reaccionan con inmunoglobulinas endógenas en plasma de ratón y conejo.

Las muestras de sangre utilizadas de acuerdo con la invención pueden ser tomadas en diversos momentos. Las muestras de ratón se inmunoagotan con sefarsa proteína G (Invitrogen, Carisbad, CA) antes del análisis en algunos experimentos.

30 También se describen aquí el diagnóstico y la eficacia de ensayo de un tratamiento para una enfermedad o afección asociada a una actividad aberrante de ADAMTS13 tal como se define en las reivindicaciones. Estas enfermedades o afecciones incluyen púrpura trombocitopénica trombótica (PTT o enfermedad de Moschcowitz). La PTT es una enfermedad rara del sistema de coagulación sanguínea que provoca la formación de extensos coágulos sanguíneos microscópicos en los vasos sanguíneos pequeños por todo el cuerpo. La mayor parte de los casos de PTT resultan de una deficiencia o inhibición de la enzima ADAMTS13, que es responsable de la división de multímeros grandes de FvW.  
35 Los glóbulos rojos que pasan por los coágulos microscópicos son sometidos a tensión de cizalladura, lo que conduce a hemólisis. La reducción del flujo sanguíneo y los daños celulares resultan en un daño orgánico final. La terapia actual se basa en soporte y plasmaféresis para reducir los anticuerpos circulantes contra ADAMTS13 y reponer los niveles de la enzima en sangre.

40 Se ha comprobado que individuos con PTT congénita o PTT adquirida presentan una deficiencia grave de ADAMTS13. La ADAMTS13 es una metaloproteínasa responsable de la ruptura del FvW, una proteína que une plaquetas, coágulos sanguíneos y la pared del vaso sanguíneo en el proceso de coagulación sanguínea. Las moléculas de FvW muy grandes son más propensas a la coagulación. Por tanto, sin una división apropiada del FvW por ADAMTS13, la coagulación se produce a mayor velocidad, en especial en la parte del sistema vascular donde el FvW tiene la mayor actividad debido a una alta tensión de cizalladura: en la microvasculatura. La deficiencia congénita de ADAMTS13 está provocada por mutaciones del gen ADAMTS13. Los individuos con la forma familiar tienen una deficiencia grave de proteasa. La mutación del gen ADAMTS13 en la PTT familiar provoca una inactividad o una actividad reducida de la ADAMTS13. La deficiencia adquirida tiene lugar con la producción de autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS13. La PTT adquirida es idiopática y secundaria a complicaciones tales como enfermedad autoinmune,  
45 malignidad, trasplante de células madre, embarazo (en especial en el tercer trimestre), determinados fármacos (incluyendo ticlopidina, mitomicina, clopidogrel y ciclosporina) o infección. También se describen aquí métodos para medir la actividad de ADAMTS13 en la sangre y para examinar la eficacia de tratamiento de enfermedades asociadas a unos niveles o una actividad anormales de la ADAMTS13 en la sangre.

55 La deficiencia de ADAMTS13 se descubrió originalmente en el síndrome de Upshaw-Shulman, la forma familiar recidivante de la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Antes de ese momento ya se sospechaba que la PTT se también se producía en la forma autoinmune, debido a su respuesta a la plasmaféresis y la caracterización de

inhibidores de IgG. Desde el descubrimiento de la ADAMTS13 se ha comprobado que epítopos específicos sobre su superficie son el objetivo de anticuerpos inhibidores.

Se ha informado de más de 70 mutaciones en el gen de ADAMTS13 en personas con la forma familiar de PTT. La mayor parte de estas mutaciones cambian aminoácidos simples en la enzima ADAMTS13. Otras mutaciones conducen a la producción de una versión anormalmente pequeña de ADAMTS13 que no puede funcionar adecuadamente. Las mutaciones en el gen ADAMTS13 reducen gravemente la actividad de la enzima ADAMTS13. Como resultado, el FvW no es procesado normalmente en la corriente sanguínea. Si el FvW no es procesado normalmente por la ADAMTS13, promueve la formación de coágulos anormales por todo el cuerpo induciendo a que las plaquetas se peguen entre sí y se adhieran a las paredes de los vasos sanguíneos, incluso en ausencia de herida. Probablemente, factores adicionales tales como embarazo, diarrea, cirugía e infección juegan un papel en la provocación de una coagulación anormal. Los coágulos sanguíneos pueden bloquear el flujo de sangre en los vasos pequeños, provocando daños en el cerebro, riñones, corazón y otros órganos. Una coagulación anormal también provoca otras complicaciones asociadas con la PTT.

El síndrome de PTT se caracteriza por hemólisis angiopática y agregación plaquetaria/trombos hialinos, cuya formación no está relacionada con la actividad del sistema de coagulación. Los microtrombos plaquetarios predominan; se forman en la microcirculación (es decir, arteriolas, capilares) por todo el cuerpo provocando una oclusión parcial de vasos. Se produce isquemia orgánica, trombocitopenia y fragmentación de eritrocitos (es decir, esquistocitos). Los trombos ocluyen parcialmente el lumen vascular con células endoteliales proliferativas superpuestas. Los endotelios de los riñones, el cerebro, el corazón, el páncreas, el bazo y las glándulas suprarrenales son particularmente vulnerables a la PTT. El hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal, la vesícula biliar, los músculos esqueléticos, la retina, la glándula pituitaria, los ovarios, el útero y los testículos también resultan afectados en menor medida. No se producen cambios inflamatorios.

En 1982, Moake y sus colegas observaron multímeros de FvW ultralargo (FvWUL) en el plasma de cuatro individuos con PTT recurrente (Moake JL, Semin. Hematol. 34:83-89, 1997; Moake JL, Semin. Hematol. 41:4-14, 2004). Estos multímeros tenían el mismo tamaño que los observados en las células endoteliales. El plasma de individuos normales tiene un FvW mucho más pequeño. Moake sugería que había una deficiencia en una enzima que reduce el FvW grande a su tamaño normal en plasma en individuos con PTT. También se señaló que este FvW grande tiene una mayor capacidad para adherirse a plaquetas, mediando en la formación de trombos.

La presente sección proporciona una descripción de la relación entre la función biológica de la ADAMTS13 y la existencia de multímeros de FvWUL y la aparición de síntomas clínicos de la PTT o similares a la PTT en la medida en que dicha descripción facilitará una mayor comprensión de los métodos aquí descritos. Existe una relación entre la función biológica de la ADAMTS13 y la existencia de multímeros de FvWUL y la aparición de síntomas clínicos de la PTT o similares a la PTT. La patogénesis de la PTT se debe a la aglutinación plaquetaria en la microvasculatura. Se produce una mayor adherencia de los multímeros de FvWUL, que conduce a la formación de trombos plaquetarios debido a la falta de una enzima proteolítica funcional (ADAMTS13) para dividir estos multímeros.

La PTT también puede estar relacionada con cáncer, quimioterapia, infección por VIH, terapia hormonal sustitutiva y estrógenos y diversas medicaciones comúnmente utilizadas (incluyendo ticlopidina, clopidogrel y ciclosporina A). Las enfermedades sistémicas de tejido conjuntivo son otros estados, aparte de la PTT, que están asociados en algunos casos con niveles bajos, pero detectables, de ADAMTS13. La ADAMTS13 recombinante (ADAMTS13r) es una de muchas terapias probadas en el tratamiento de la PTT. Se describen aquí métodos para examinar la eficacia de la ADAMTS13r y sus terapias asociadas a enfermedades relacionadas con la ADAMTS13.

Un bajo nivel de ADAMTS13 provoca la aglutinación de sustancias coagulantes (plaquetas) en la sangre. Como las plaquetas se aglutinan entre sí, en la corriente sanguínea hay menos plaquetas disponibles. Esta aglutinación o agregación puede conducir a hemorragias bajo la piel y manchas de color morado llamadas púrpura. También puede producir la ruptura de glóbulos rojos (experimentar hemólisis), ya que éstos son sometidos a tensión de cizalladura cuando pasan por los coágulos plaquetarios microscópicos. Por tanto, los glóbulos rojos se destruyen prematuramente. La reducción del flujo sanguíneo y los daños celulares resultan en un daño orgánico final.

Los niveles de antígeno de ADAMTS13 humano se pueden determinar con ELISA (Rieger et al., Thromb. Haemost. 95:212-220, 2006). La actividad de la ADAMTS13 se puede medir en base a la reducción de la afinidad de unión de colágeno del FvW degradado (Gerritsen et al., Thromb. Haemost. 82:1386-1389, 1999), que es un ensayo funcional basado en la unión preferencial de formas de FvW de alto peso molecular con colágeno. En este ensayo, la muestra de plasma diluida a examinar se añade a plasma normal en el que se ha suprimido la actividad de proteasa. El FvW presente en el plasma con proteasa agotada es digerido por la proteasa divisora de FvW en el plasma de ensayo. La degradación proteolítica conduce a formas de FvW de bajo peso molecular, que muestran una unión reducida con placas de microtitulación revestidas con colágeno humano de tipo III. El FvW unido a colágeno se cuantifica utilizando un anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa contra FvW humano. Los valores de la actividad de proteasa divisora

de FvW en las muestras de plasma examinadas son leídos a partir de una curva de calibración obtenida incubando el sustrato de FvW con diluciones de una reserva (pool) de plasma humano normal (PHN).

5 La terapia actual para la púrpura o PTT se basa en soporte y plasmaféresis para reducir los anticuerpos circulantes contra la ADAMTS13 y reponer los niveles de ADAMTS13 en la sangre. El intercambio de plasma ha sido la terapia de primera línea para la PTT desde 1991. La deficiencia congénita puede sustituir la deficiencia y mutaciones en el gen de ADAMTS13 mediante infusión de plasma. La deficiencia adquirida puede eliminar el inhibidor de la ADAMTS13 mediante plasmaféresis. Sin embargo, el intercambio de plasma es un tratamiento más eficaz que la infusión de plasma. Este estado, que pone en peligro la vida, puede tener un resultado positivo si se reconoce precozmente y la intervención médica se inicia pronto.

10 Además, un aumento de los niveles circulantes de FvW y una disminución de la actividad de la ADAMTS13 en humanos son considerados factores de riesgo de apoplejía isquémica (Zhao et al., American Society of Hematology, Resumen 259, 6-9 de diciembre de 2008, San Francisco, CA.). Por tanto, los métodos de medida de la actividad de ADAMTS13 *in vivo* de la presente memoria también son aplicables en el diagnóstico y la terapia de la apoplejía.

15 Además, la presente descripción se refiere a métodos para diagnosticar un procesamiento anormal del FvW o deficiencias en la concentración o la actividad de la ADAMTS13, y para examinar terapias para aumentar la concentración o la actividad de la ADAMTS13 utilizadas en el desarrollo de nuevas terapias en el tratamiento de la PTT y otras patologías o afecciones relacionadas con la ADAMTS13. En diversos aspectos, otras patologías o afecciones relacionadas con la ADAMTS13 incluyen enfermedades caracterizadas por niveles anormales de FvW o un procesamiento anormal del FvW.

20 La presente sección proporciona una descripción del síndrome de FvW en la medida en que dicha descripción facilitará una mayor comprensión de los métodos de la invención. El síndrome de FvW se manifiesta clínicamente cuando existe una producción insuficiente o una producción excesiva de FvW. La producción excesiva de FvW provoca un aumento de las trombosis (formación de coágulos o trombos en un vaso sanguíneo que obstruyen el flujo de sangre), mientras que los niveles reducidos o la carencia de formas de alto peso molecular de FvW provoca un aumento de las hemorragias y un mayor tiempo de hemorragia, debido a la inhibición de la agregación plaquetaria, y del cierre de las heridas. Los métodos de la invención pueden emplearse en el diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de síndrome de FvW.

30 Una deficiencia de FvW también puede producir una hemofilia A fenotípica, dado que el FvW es un componente esencial del FVIII funcional. En estos casos, la vida media del factor VIII se reduce hasta tal punto que resulta afectada su función en la cascada de coagulación sanguínea. Los individuos que padecen EvW o síndrome de FvW frecuentemente presentan una deficiencia de FVIII. En estos individuos, la actividad de FVIII reducida no es consecuencia de un defecto en el gen cromosómico X, sino consecuencia indirecta de uno o más cambios cuantitativos y cualitativos del FvW en el plasma. La diferenciación entre hemofilia A y EvW se puede llevar a cabo normalmente midiendo el antígeno de FvW o determinando la actividad de cofactor de ristocetina. La actividad de cofactor de ristocetina se mide añadiendo ristocetina y un sustrato plaquetario al plasma del individuo. La ristocetina aumenta la unión del FvW con el receptor Ib de glicoproteína plaquetario, lo que resulta en una aglutinación. El FvW del individuo apoyará la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina medida mediante un cambio en la transmisión de la luz. Por tanto, este ensayo es una medición *in vitro* de la actividad funcional del FvW del individuo. Tanto el contenido de antígeno de FvW como la actividad de cofactor de ristocetina descienden en la mayoría de los individuos con EvW, mientras que estos parámetros son normales en individuos con hemofilia A.

40 La EvW es una alteración hemorrágica hereditaria causada por una deficiencia o disfunción del FvW. Por tanto, los defectos en el FvW pueden causar hemorragias afectando negativamente a la adhesión plaquetaria o reduciendo la concentración de FVIII. La EvW se diagnostica después de un examen clínico y físico, con indicios personales y familiares de hemorragias (principalmente mucocutáneas), y se confirma mediante análisis en laboratorio. Los análisis en laboratorio normalmente conllevan análisis plasmáticos iniciales de coagulante de factor VIII (FVIII:C), proteína de factor von Willebrand (FvW) (antígeno; FvW:Ag), y función o actividad del FvW, que se evalúa utilizando el ensayo de cofactor de ristocetina (FvW:CoR) o el ensayo de unión de colágeno (FvW:AUC). El FvW:AUC se basa en la medida de la cantidad de FvW unido a colágeno de modo similar al procedimiento para un ensayo de inmunoadsorción enzimática. Algunos análisis de laboratorio adicionales pueden comprender una serie de ensayos de confirmación y de asistencia de subtipos de EvW, incluyendo la evaluación de FvW:multímeros.

50 Más específicamente, el ensayo FvW:Ag es un ensayo cuantitativo y proporciona una medida del nivel general de FvW presente en el plasma de un paciente; no es un ensayo funcional y no proporciona información referente a la calidad del FvW presente. El ensayo FvW:AUC es un ensayo funcional que proporciona información sobre la calidad del FvW presente. Los ensayos FvW:Ag y FvW:AUC son ensayos complementarios y, en diversos aspectos, se utilizan combinados. El ensayo FvW:CoR es un ensayo tanto cuantitativo como cualitativo, que proporciona información sobre la presencia de FvW que se encuentra entre la proporcionada individualmente por los ensayos FvW:Ag y FvW:AUC. El ensayo FvW:multímero es un procedimiento cuantitativo y es semicuantitativo. El ensayo FvW:multímero proporciona

una instantánea del FvW presente. Los ensayos arriba descritos son bien conocidos en la técnica de análisis de FvW *in vitro*.

5 Los métodos previstos también incluyen, en diversos aspectos, el uso de FvW. Todas las formas de FvW y FvW recombinante son tenidas en cuenta para su uso en los métodos de la invención. En algunos aspectos, el FvW utilizado en los métodos de la invención incluye, pero no se limita a, HUMATEP®, e IMMUNATE®, INNOBRAND®, y 8Y®.

10 El FvW recombinante puede ser administrado en una dosis de al menos aproximadamente 10 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 20 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 30 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 40 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 50 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 60 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 70 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 80 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 90 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 100 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 150 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 200 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 250 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 300 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 350 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 400 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 450 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 500 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 550 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 600 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 650 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 700 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 750 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 800 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 850 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 900 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 950 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 1.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 1.200 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 1.400 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 1.600 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 1.800 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 2.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 2.500 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 3.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 3.500 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 4.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 4.500 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 5.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 6.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 7.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 8.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 9.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 10.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 20.000 UCoR/kg PC, de al menos aproximadamente 50.000 UCoR/kg PC, y de al menos aproximadamente 100.000 UCoR/kg PC, y hasta más de 100.000 UCoR/kg PC.

30 En diversos aspectos de los métodos de la invención, la eficacia de un tratamiento se analiza tal como se define en las reivindicaciones. También se describe aquí que el tratamiento puede consistir en la administración de ADAMTS13 recombinante a un individuo. La ADAMTS13 humana recombinante ya ha sido descrita (Plaimauer et al., Blood 100:3626-3632, 2002). La ADAMTS13 humana recombinante todavía no está disponible comercialmente para su administración a humanos, pero la invención incluye el uso de dicha ADAMTS13r en ensayos clínicos y cuando está comercialmente disponible. En individuos con una deficiencia hereditaria de ADAMTS13 se utiliza plasma humano normal como fuente de ADAMTS13 y contiene UI/ml de ADAMTS13. Actualmente existe ADAMTS13 recombinante o derivada de plasma purificado comercialmente disponible para su uso en animales en un intervalo de dosis de 100-500 U/kg PC. Los métodos de la invención prevén el uso de cualquiera de estas fuentes administradas en una dosis apropiada de UI/ml o U/kg PC. En un aspecto, la invención incluye la administración de ADAMTS13r en una dosis de al menos aproximadamente 10 U/kg PC, de al menos aproximadamente 20 U/kg PC, de al menos aproximadamente 30 U/kg PC, de al menos aproximadamente 40 U/kg PC, de al menos aproximadamente 50 U/kg PC, de al menos aproximadamente 60 U/kg PC, de al menos aproximadamente 70 U/kg PC, de al menos aproximadamente 80 U/kg PC, de al menos aproximadamente 90 U/kg PC, de al menos aproximadamente 100 U/kg PC, de al menos aproximadamente 150 U/kg PC, de al menos aproximadamente 200 U/kg PC, de al menos aproximadamente 250 U/kg PC, de al menos aproximadamente 300 U/kg PC, de al menos aproximadamente 350 U/kg PC, de al menos aproximadamente 400 U/kg PC, de al menos aproximadamente 450 U/kg PC, de al menos aproximadamente 500 U/kg PC, de al menos aproximadamente 550 U/kg PC, de al menos aproximadamente 600 U/kg PC, de al menos aproximadamente 650 U/kg PC, de al menos aproximadamente 700 U/kg PC, de al menos aproximadamente 750 U/kg PC, de al menos aproximadamente 800 U/kg PC, de al menos aproximadamente 850 U/kg PC, de al menos aproximadamente 900 U/kg PC, de al menos aproximadamente 950 U/kg PC, de al menos aproximadamente 1.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 1.200 U/kg PC, de al menos aproximadamente 1.400 U/kg PC, de al menos aproximadamente 1.600 U/kg PC, de al menos aproximadamente 1.800 U/kg PC, de al menos aproximadamente 2.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 2.500 U/kg PC, de al menos aproximadamente 3.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 3.500 U/kg PC, de al menos aproximadamente 4.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 4.500 U/kg PC, de al menos aproximadamente 5.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 6.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 7.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 8.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 9.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 10.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 20.000 U/kg PC, de al menos aproximadamente 50.000 U/kg PC, y de al menos aproximadamente 100.000 U/kg PC, y hasta más de 100.000 U/kg PC.

60 En diversos aspectos de los métodos de la invención, los métodos se llevan a cabo dentro de un intervalo de temperaturas. En determinados aspectos, la invención incluye métodos que comprenden temperaturas de

aproximadamente 20°C, aproximadamente 21°C, aproximadamente 22°C, aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 31°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 33°C, aproximadamente 34°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 36°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 38°C, aproximadamente 39°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 41°C, aproximadamente 42°C, aproximadamente 43°C, aproximadamente 44°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 46°C, aproximadamente 47°C, aproximadamente 48°C, aproximadamente 49°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 51°C, aproximadamente 52°C, aproximadamente 53°C, aproximadamente 54°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 56°C, aproximadamente 57°C, aproximadamente 58°C, aproximadamente 59°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 61°C, aproximadamente 62°C, aproximadamente 63°C, aproximadamente 64°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 66°C, aproximadamente 67°C, aproximadamente 68°C, aproximadamente 69°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 71°C, aproximadamente 72°C, aproximadamente 73°C, aproximadamente 74°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 76°C, aproximadamente 77°C, aproximadamente 78°C, aproximadamente 79°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 90°C, y aproximadamente 100°C. En un aspecto, la invención incluye métodos que comprenden temperaturas de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C. En un aspecto particular, la invención incluye métodos que comprenden temperaturas de aproximadamente 30°C a aproximadamente 35°C. En un aspecto, la invención incluye métodos que comprenden una temperatura de aproximadamente 32°C.

En algunos aspectos de la invención, los métodos previstos se llevan a cabo a lo largo de un período de tiempo. En diversos aspectos, la invención incluye métodos que comprenden tiempos de aproximadamente 5 segundos, aproximadamente 10 segundos, aproximadamente 15 segundos, aproximadamente 20 segundos, aproximadamente 25 segundos, aproximadamente 30 segundos, aproximadamente 35 segundos, aproximadamente 40 segundos, aproximadamente 45 segundos, aproximadamente 50 segundos, aproximadamente 55 segundos, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 7 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 9 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 55 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, y aproximadamente 96 horas. En determinados aspectos, el tiempo oscila entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 3 horas. En aspectos particulares, el tiempo oscila entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 1 hora. En aspectos más particulares, el tiempo oscila entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 30 minutos. En un aspecto, el tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En otro aspecto, el tiempo es de aproximadamente 15 minutos.

Los métodos previstos se llevan a cabo bajo tensión de cizalladura tal como se define en las reivindicaciones. En diversos aspectos, la tensión de cizalladura comprende una velocidad de cizalladura de aproximadamente  $100 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $200 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $300 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $400 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $500 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $600 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $700 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $800 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $900 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $1.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $2.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $3.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $4.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $5.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $6.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $7.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $8.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $9.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $10.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $11.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $12.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $13.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $14.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $15.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $16.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $17.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $18.000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente  $19.000 \text{ s}^{-1}$ , y aproximadamente  $20.000 \text{ s}^{-1}$ . En determinados aspectos, la tensión de cizalladura comprende una velocidad de cizalladura de aproximadamente 100 a aproximadamente  $10.000 \text{ s}^{-1}$ . En otros aspectos, la tensión de cizalladura comprende una velocidad de cizalladura de aproximadamente  $1.000 \text{ s}^{-1}$  a aproximadamente  $8.000 \text{ s}^{-1}$ . En un aspecto, la velocidad de cizalladura es de aproximadamente  $6.000 \text{ s}^{-1}$ .

Tal como se utilizan aquí, el FvWr o la ADAMTS13r se pueden administrar al mamífero en cualquier dosis, incluyendo una variedad de dosis. La dosificación se puede basar en el peso corporal, en la actividad del FvW, en la actividad de la proteasa ADAMTS13, en la vía de administración, en la salud o el estado del mamífero receptor, y en diversos factores tal como es sabido por los expertos.

### Ejemplos

A partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos y no limitativos, se evidenciarán aspectos y detalles adicionales de la invención. El Ejemplo 1 demuestra que la susceptibilidad del FvWr humano a la división por ADAMTS13 varía entre especies. El Ejemplo 2 muestra la cuantificación y detección de productos de división derivados de ADAMTS13 en plasma. El Ejemplo 3 describe la detección de fragmentos de división de FvW en plasma de individuos tratados con FvW recombinante. El Ejemplo 4 describe la detección de fragmentos de división de FvW

después de proteólisis de FvW mediada por ADAMTS13 bajo tensión de cizalladura. El Ejemplo 5 describe la detección del efecto de la ADAMTS13 recombinante en FvW endógeno en plasma.

**Ejemplo 1: La susceptibilidad del factor de von willebrand recombinante humano a la división por adamts13 varía entre especies**

5 Tal como se ha expuesto aquí más arriba, el tamaño multimérico del FvW y en consecuencia la actividad del FvW se regulan mediante la actividad de la ADAMTS13 en la sangre. El objetivo del estudio era determinar la susceptibilidad del FvWr humano a la división por ADAMTS13 presente en el plasma de diferentes especies de animales. La capacidad de la ADAMTS13 de diferentes especies para dividir FvWr humano se examinó tanto *in vitro* como *in vivo*.

10 Determinación de la actividad de la ADAMTS13: Unas muestras de plasma diluidas de diversos animales se trataron con cloruro de bario para activar la ADAMTS13. Después se añadió FvWr humano (1 U/ml) (obtenido a partir de células CHO por fermentación y purificación (Turecek et al., Blood 108: Abstract 1017, 2006; American Society of Hematology Annual Meeting Abstracts)) y la mezcla se incubó durante 24 horas bajo condiciones desnaturalizantes (urea 1,5 M). La actividad de ADAMTS13 se determinó mediante diversos ensayos tal como se describe más abajo.

15 Ensayo de actividad de unión de colágeno (FvW:AUC): Las muestras se incubaron en pocillos revestidos con colágeno. El FvWr unido se detectó utilizando un anticuerpo de FvW antihumano policlonal (DAKO, Dinamarca). La actividad de la ADAMTS13 en las muestras de plasma se expresó como porcentaje de la actividad de FvW:AUC residual en comparación con FvWr no dividido y los datos se representaron en curvas dosis-respuesta (diluciones 1:20 a 1:3.000) o como porcentaje de la disminución de la actividad de unión de colágeno (AUC) en comparación con plasma humano normal (PHN) (dilución 1:20, equivalente a actividad de 50 mU/ml de ADAMTS13 humana). Tal como se describe aquí más arriba, el FvW:AUC es un ensayo funcional que proporciona información tanto cuantitativa como cualitativa sobre la  
20 calidad del FvW presente.

25 Ensayo de actividad de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET): La actividad proteolítica de la ADAMTS13 se midió utilizando un péptido de FvW sintético con marcado fluorescente compuesto por 73 aminoácidos (FRETS-VWF73, Peptides Institute, Osaka, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma (actividad de la ADAMTS13) se midieron contra una curva de referencia preparada a partir de plasma humano normal (PHN) diluido y se expresaron como porcentaje de PHN.

30 Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) e inmunotransferencia: La SDS-PAGE se llevó a cabo bajo condiciones reductoras y no reductoras utilizando un gradiente (3%-8%) de geles de Tris-acetato seguidos por proteínas de electrotransferencia sobre membranas de PVDF e incubación con anticuerpos de FvW antihumano de conejo monoclonales (MoAb. VW33-5: TaKaRa Bio Inc., Japón; MoAb N10: Abcam, EE.UU., Kato et al. (2006) Transfusion, 46, 1444) y policlonales (DAKO, Dinamarca). Como control, un FvWr se trató con ADAMTS13 recombinante (Plaimauer et al., Blood 100: 3626, 2002). Unos anticuerpos secundarios se marcaron bien con fosfatasa alcalina (FA), bien con peroxidasa de rábano (PR). Las proteínas se visualizaron utilizando un *kit* de detección de FA o de quimioluminiscencia aumentada (QA). El análisis de multímeros se llevó a cabo utilizando electroforesis en gel de  
35 agarosa-SDS horizontal de alta resolución seguida por inmunotinción con un anticuerpo de FvW antihumano de conejo policlonal.

Animales: Las muestras de plasma de animal utilizadas en este estudio se tomaron de monos (Rhesus y Cynomolgus), conejos (blancos de Nueva Zelanda), cerdos (Yorkshire), perros (Beagle), cobayas (Dunkin Hartley), ratas (Sprague Dawley), y ratones (con deficiencia de FvW (def) y deficiencia de ADAMTS13 (ambos con antecedentes C57BL).

40 Estudios *in vivo*: Los conejos blancos de Nueva Zelanda fueron tratados con 1.200 UI de actividad de FvW:Cofactor de Ristocetina (FvW:CoR)/kg de peso corporal (PC) por inyección intravenosa. Tal como se describe aquí más arriba, el ensayo de FvW:CoR es un método para medir la concentración/actividad del FvW. Por consiguiente, la concentración de FvW frecuentemente se indica en unidades de FvW:CoR. Antes de la inyección de FvWr y en diversos momentos después de la inyección se tomaron muestras de sangre de la arteria auricular central de los conejos. Se preparó plasma citratado y se guardó congelado. Los ratones fueron tratados con 2.000 UI de FvW:CoR/kg PC solo o cotratado con ADAMTS13r a razón de 19,4 µg/kg PC por inyección intravenosa. Se tomaron muestras de sangre de los ratones por punción cardíaca y se preparó plasma citratado, que se guardó congelado. Las muestras de plasma de ratón de los estudios *in vivo* se inmunogotaron con perlas de sefarosa de proteína G antes de la carga de geles para evitar la reactividad de MoAbs con IgG endógenas.

50 División de FvWr por ADAMTS13 humana

En la Figura 1 se muestran los cambios en la estructura multimérica del FvWr después de división por ADAMTS13 humana. Los multímeros de FvW en plasma humano normal (PHN) muestra bandas satélite como resultado de la división por ADAMTS13 (véase la Figura 1A). El FvW recombinante contiene multímeros de alto peso molecular sin

estructuras satélite (véase la Figura 1B). La incubación de FvWr con ADAMTS13 bajo condiciones desnaturalizantes conduce a la reducción de cantidades multiméricas con aparición de multímeros inferiores y bandas satélite.

En la Figura 2 se muestra la división específica de monómeros de FvWr por ADAMTS13. La división específica de los monómeros de FvWr por ADAMTS13 resulta en un fragmento N-terminal de 140 kDa y un fragmento C-terminal de 176 kDa, que pueden ser detectados por inmunotransferencia. En la Figura 2A se muestran resultados de inmunotransferencia utilizando SDS-PAGE reductora con anticuerpos monoclonales para FvW. El anticuerpo monoclonal N10 detecta el fragmento N-terminal de 140 kDa del FvW únicamente cuando éste es dividido por ADAMTS13 entre Tyr<sup>1605</sup> y Met<sup>1606</sup> (ninguna reacción con el FvW intacto). El anticuerpo monoclonal VW33-5 detecta el fragmento C-terminal de 176 kDa y el FvW intacto. En la Figura 2B se muestran resultados de inmunotransferencia utilizando SDS-PAGE no reductora con un anticuerpo policlonal para FvW. El anticuerpo anti-FvW de conejo policlonal detecta tanto fragmentos de división como los multímeros de FvW intactos.

#### División *in vitro* de FvWr por ADAMTS13 de diferentes especies de animales

La división de FvWr dependiente de ADAMTS13 se detectó mediante la actividad de unión de colágeno FvW residual (FvW:AUC) (véase la Figura 3). La actividad de la ADAMTS13, medida mediante FRETs y FvW:AUC, también se muestra en la Figura 4. La actividad de la ADAMTS13 se expresa como porcentaje de PHN. La actividad enzimática de la ADAMTS13 en plasma de conejo era tan alta como la de plasma humano (medida mediante AUC y FRETs). En muestras de *Cynomolgus* y Rhesus, cerdos y perros se observó menos actividad de la ADAMTS13. Sin embargo, la FRETs mostraba una actividad de las ADAMTS13 superior a la de la AUC. En muestras de plasma derivadas de ratones con deficiencia de FvW, ratones con deficiencia de ADAMTS13, ratas y cobayas se detectó muy poca o ninguna actividad de la ADAMTS13.

La visualización de la división de FvW por ADAMTS13 utilizando análisis multimérico de alta resolución (véase la Figura 5) mostró que la degradación del FvWr inducida por plasma de conejo y la formación de bandas satélite similares a las del plasma humano normal (PHN). Los monos *Cynomolgus*, los monos Rhesus, los cerdos y los perros también mostraban división específica del FvWr, pero en menor medida. No se observó ningún cambio relevante con plasma de cobayas, ratas y ratones en comparación con FvWr incubado con tampón.

El uso de inmunotransferencia para visualizar la división de FvWr por ADAMTS13 (véanse las Figuras 6 y 7) demostraba que la intensidad de las bandas (FvW dividido) generalmente estaba en buena correlación con los resultados del ensayo de FvW:AUC. La Figura 6 muestra los resultados de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras seguida por inmunotransferencia con anticuerpo de FvW antihumano policlonal unido con PR. Este anticuerpo de FvW antihumano policlonal detecta tanto fragmentos de división de FvW (140 y 176 kDa) como multímeros intactos y es más sensible pero menos específico que los anticuerpos monoclonales. Los resultados de inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal (véase la Figura 6) indicaban la división de FvWr humano después de la incubación con plasma de humano, conejo, mono, cerdo o perro, pero no con plasma de cobaya, rata o ratón.

Con el anticuerpo monoclonal VW33-5 se obtuvo un resultado comparable (véase la Figura 7). La Figura 7 muestra los resultados de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras seguida por inmunotransferencia con anticuerpos de FvW monoclonales. Tal como se indica aquí más arriba, el anticuerpo monoclonal VW33-5 detecta el fragmento C-terminal de 176 kDa y el FvW intacto, mientras que el anticuerpo monoclonal N10 detecta el fragmento N-terminal de 140 kDa únicamente cuando éste es dividido por ADAMTS13 entre Tyr<sup>1605</sup> y Met<sup>1606</sup>. La división del FvW por ADAMTS13 también se detectó mediante el anticuerpo N10 (véanse las bandas de 140 kDa en la Figura 7). El asterisco en la Figura 7 indica reacciones del anticuerpo de IgG antiratón de cabra (secundario) con IgG de plasma de ratón endógeno. Estas reacciones impedían la visualización del monómero de 140 kDa con el anticuerpo N10 en las muestras de ratón. En general, la intensidad de las bandas estaba en buena correlación con los resultados de ensayos de AUC.

En plasma de humano, conejo, monos *Cynomolgus* y Rhesus, la división específica de los monómeros de FvWr por ADAMTS13 se demostró mediante inmunotransferencia. En cerdos y perros eran detectables niveles bajos del fragmento de 176 kDa. Cuando la incubación se realizó con plasma de cepas de ratón C57BL, ratas y cobayas, no era visible ningún fragmento de FvWr.

#### División *in vivo* de FvWr por ADAMTS13 de diferentes especies de animales

La división *in vivo* específica del FvWr (1.200 UI FvW:CoR/kg) por ADAMTS13 (fragmentos de 140 kDa y 176 kDa) en conejos se detectó con anticuerpos monoclonales mediante inmunotransferencia después de SDS-PAGE reductora (véanse las Figuras 8A y B). Como controles se muestran FvWr no dividido y FvWr dividido con ADAMTS13r *in vitro*. También se ven cambios característicos en el patrón multimérico poco después de la administración del FvWr (véase la Figura 8C).

La Figura 9 muestra la división *in vivo* específica de FvWr (2.000 UI FvW:CoR/kg) por ADAMTS13 en ratones con deficiencia de FvW y con deficiencia de ADAMTS13. El fragmento de división de FvW de 176 kDa no era visible en

ninguna de las dos cepas de ratón utilizando el anticuerpo monoclonal específico para el fragmento C-terminal (VW33-5) (Figura 9A) después de SDS-PAGE no reductora. El asterisco indica reacciones del anticuerpo de IgG antiratón de cabra con IgG de plasma de ratón. Estas reacciones impedían la visualización del monómero de 140 kDa con el anticuerpo N10. No se observó ningún cambio detectable en el patrón multimérico de FvWr (Figura 9B). Los homodímeros de 140 kDa y 176 kDa solo eran detectables en ratones con deficiencia de FvW, pero no en ratones con deficiencia de ADAMTS13, utilizando el anticuerpo policlonal más sensible (pero menos específico) bajo condiciones no reductoras (Figura 9C).

Se llevó a cabo una comparación directa de la eficiencia de división por ADAMTS13 en los modelos animales bajo SDS-PAGE no reductora con carga de cantidades iguales de FvW:Ag (véase la Figura 10). En muestras de plasma de conejo era detectable una banda más fuerte correspondiente al producto de división de FvW de 176 kDa en comparación con la muestra de ratón con deficiencia de FvW. En el plasma de ratón con deficiencia de ADAMTS13 no era detectable ninguna división. La coinyección de FvWr con ADAMTS13r humana indujo la división del FvWr. Las pistas de control 1-3 en la Figura 10 representan FvWr no dividido (1), FvWr premezclado con ADAMTS13r (2), y FvWr dividido *in vitro* por ADAMTS13r (3).

En plasma de Cynomolgus se detectaron fragmentos de división de FvW después de una inyección de dosis única de FvWr (100 UI/kg) (véase la Figura 11). Se midieron fragmentos de FvWr (1 Ag U/ml) completa y parcialmente degradado por ADAMTS13 en plasma de Cynomolgus después de una inyección de dosis única de FvWr por transferencia Western bajo condiciones no reductoras después de 15 segundos de exposición con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo (Figura 11A). En plasma de Cynomolgus se vio una banda de la línea base de degradación (dímero de 176 kDa) antes de la inyección de FvWr. Después de la inyección de FvWr se vio un aumento de la cantidad del dímero de FvW de 176 kDa. El dímero de FvW de 176 kDa era mayor que la línea base (antes de la inyección) incluso 24 horas después de la inyección de FvW (Figura 13A), cuando no se midió antígeno de FvW elevado (FvW:Ag) (Figura 11B).

Estos resultados muestran que se descubrieron diferencias sustanciales en la susceptibilidad a la división *in vivo* de FvWr humano por ADAMTS13 entre el plasma de diferentes especies de animales. El plasma de conejo era tan eficaz en la proteólisis de FvWr humano como el plasma humano homólogo. Las muestras de plasma de mono Cynomolgus, mono Rhesus, cerdo y perro mostraban una actividad proteolítica de ADAMTS13 media con respecto al FvWr humano. Las muestras de plasma de ratón con deficiencia de FvW, rata y cobaya prácticamente no mostraban ninguna actividad de ADAMTS13 con respecto al FvWr humano.

Los estudios *in vivo* con inyección de altas dosis de FvWr en conejos y ratones confirmaron los resultados *in vitro*. La división residual observada en los ratones con deficiencia de FvW se confirmó por la ausencia de división en los ratones con deficiencia de ADAMTS13. En el plasma de conejo, el FvWr se dividía eficazmente tal como demostraban los fragmentos de división específica de FvW por ADAMTS13 y la formación de bandas satélite multiméricas. En el plasma de ratón con deficiencia de FvW y con deficiencia de ADAMTS13, apenas se observaba ninguna división de FvWr. La ADAMTS13r humana podía sustituir la enzima ADAMTS13 de ratón y dividir el FvW cuando se coinyectaba con FvWr en ratones.

Estos datos demuestran una mala compatibilidad de especies entre FvWr humano y ADAMTS13 endógena presente en plasma de ratones, ratas y cobayas. La ADAMTS13 presente en el plasma de mono Cynomolgus, mono Rhesus, cerdo y perro mostraba mejor actividad proteolítica frente al FvWr humano; no obstante, la actividad proteolítica de ADAMTS13 seguía siendo inferior que la actividad de ADAMTS13 frente a FvWr humano. La actividad de ADAMTS13 de conejo parecía ser tan eficaz en la proteólisis de FvWr humano como el plasma humano homólogo. Estas diferencias entre especies en la actividad/especificidad proteolítica de ADAMTS13 deberían ser tenidas en consideración al evaluar la eficacia, la (pato) fisiología, y el metabolismo de FvWr humano en diferentes animales. Este estudio también sugiere que el conejo, y el plasma de conejo en general, puede ser útil como modelo para evaluar y ensayar FvWr humano.

El método también es adecuado para detectar el efecto de ADAMTS13 endógena en FvWr inyectado en diversos modelos animales. Los métodos de la invención permiten investigar la idoneidad de diversos modelos animales para determinar el efecto de ADAMTS13 en FvWr en diferentes especies.

## **Ejemplo 2: Cuantificación y detección de productos de división derivados de ADAMTS13 en plasma**

El objetivo del estudio era desarrollar un ensayo para determinar si la división de FvW mediada por ADAMTS13 (es decir, fragmentos de FvW) podría ser detectada en muestras de plasma de individuos con FvW de tipo III después de tratamiento con FvWr durante un estudio clínico.

Se utilizaron muestras de plasma humano normal, plasma humano con deficiencia grave de FvW, plasma humano con deficiencia de ADAMTS13 y plasma de Cynomolgus, obtenidas antes y después (1, 3, 9, 15 y 24 horas) de inyección de FvWr (100 UI FvW:CoR/kg). Como controles se utilizaron FvWr completa y parcialmente degradados tratados con ADAMTS13r bajo condiciones desnaturizantes.

Las muestras de plasma se aplicaron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras seguida de transferencia Western. Las transferencias se tiñeron con un anticuerpo policlonal de FvW antihumano de conejo marcado con PR (Dako), y se desarrollaron con una técnica de quimioluminiscencia aumentada (QA) plus.

5 Se midieron FvWr completa y parcialmente degradados por ADAMTS13 (1 Ag U/ml) en tampón y plasma con deficiencia de FvW por transferencia Western bajo condiciones no reductoras después de 15 segundos de exposición con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo policlonal (véase la Figura 12). Las condiciones reductoras no eran lo suficientemente sensibles para visualizar resultados. Con el análisis de transferencia Western no se detectó ninguna diferencia entre diluciones en tampón (Figura 12A) y plasma con deficiencia de FvW (Figura 12B). El fragmento C-terminal derivado de FvW (dímero de 176 kDa) se detectó utilizando QA. El FvWr completamente degradado (1 Ag U/ml) se pudo detectar en una dilución en un factor > 62,5 (16 nl/1 µl de plasma). Con otras proteínas de plasma humano no se observó ninguna reacción cruzada.

15 Aumentando la sensibilidad del ensayo mediante el aumento del tiempo de exposición (véase la Figura 13) se detectaron fragmentos de división de FvW. Unos FvWr completa y parcialmente degradados por ADAMTS13 (1 Ag U/ml) se midieron en tampón y plasma con deficiencia de FvW por transferencia Western bajo condiciones no reductoras después de 15 segundos (Figura 13A) y 60 segundos (Figura 13B) de exposición con el anticuerpo de FvW antihumano de conejo. Un fragmento de división de 176 kDa se puede ver en plasma humano normal, pero no en plasma con deficiencia de FvW (véanse las Figuras 13A y B). En plasma con deficiencia de ADAMTS13 se detectan trazas de un fragmento de división de 176 kDa (véanse las Figuras 13A y B), pero en una cantidad mucho menor en comparación con el FvW total presente. El FvWr completamente degradado (1 Ag U/ml) se detectó bien con una dilución de hasta 320 veces (2,5 nl/0,8 µl de plasma/pista) con un tiempo de exposición de 60 segundos (véase la Figura 13B).

25 El límite de detección o nivel de sensibilidad del ensayo de transferencia Western se determinó adicionalmente diluyendo muestras de plasma y aumentando el tiempo de exposición a dos minutos (Figura 14). Un plasma humano normal se diluyó en un factor 20 (de 5 nl a 100 nl) y después de dos minutos se detectó bien un producto de división de 176 kDa cuando se aplicaron 20-40 nl de plasma humano normal (en 0,8 µl de plasma con deficiencia de FvW) (0,025 - 0,05 Ag U/ml FvW) (véase la Figura 14A). En plasma con deficiencia de FvW no se pudo ver ninguna banda específica de ADAMTS13 (producto de división de FvW) (Figura 14A). Un FvWr completamente degradado (1 Ag U/ml) se diluyó en un factor 40 (de 0,5 nl a 20 nl) y pudo ser detectado, de acuerdo con la medición a través del dímero de FvW de 176 kDa, en una concentración de aproximadamente 0,0006 U/ml (0,5 nl/0,8 µl de plasma) (véase la Figura 14B).

30 La división de FvW por ADAMTS13 se midió adicionalmente en plasma cuantificando bandas de degradación de FvW (Figura 15). Un producto de división de FvW de 176 kDa se detectó bien en plasma humano normal a 20 nl aplicado en 0,8 µl de plasma con deficiencia de FvW (0,025 Ag U/ml FvW) (véase la Figura 15A). En plasma humano normal se encontró aproximadamente un 1-2% de dímeros C-terminales (el producto de división específica por ADAMTS13 de 176 kDa) cuando se realizó el cálculo a partir una curva de referencia construida a partir de la intensidad de banda de las diferentes cantidades de FvWr completamente degradado (1 Ag U/ml) (véase la Figura 15B).

35 Por tanto, se desarrolló un método de alta sensibilidad para la detección específica de bandas de división de FvW mediada por ADAMTS13 en plasma. En base a una comparación cuantitativa con un FvWr completamente degradado, aproximadamente un 1-2% de FvW:Ag total aparecía como una banda de degradación de 176 kDa en plasma humano normal. Los dímeros C-terminales (dímeros de 176 kDa) en plasma normal pueden ser detectados en un límite inferior de concentración de 0,025-0,05 U/ml de FvW:Ag.

40 Este estudio mostraba que el producto de división de FvW está en correlación con la actividad de ADAMTS13, lo que indica que este método es adecuado para detectar el efecto de ADAMTS13 endógena en FvWr inyectado *in vivo*. El método también puede emplearse como un marcador de actividad de ADAMTS13 *in vivo*. Por tanto, este ejemplo ilustra el desarrollo de un método de alta sensibilidad para medir la actividad de ADAMTS13 *in vivo* mediante el examen de productos de división de FvW en muestras de plasma.

#### 45 **Ejemplo 3: Detección de fragmentos de división de FvW en plasma de individuos antes y después del tratamiento con FvWr**

Durante un ensayo clínico en fase I, unos individuos con EvW de tipo III fueron tratados con 7,5 UI FvW:CoR/kg de peso corporal de FvWr. Se tomaron muestras de sangre antes del tratamiento y en varios momentos hasta 96 horas después del tratamiento y se analizaron en cuanto a la presencia de fragmentos de división de FvW dependiente de ADAMTS13.

50 Las muestras de plasma respectivas se aplicaron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras sobre geles de Tris-acetato al 3-8% (500 nl por pista) y a continuación se llevó a cabo una transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal de FvW antihumano de conejo marcado con PR (Dako) en combinación con una técnica de QA plus. Como controles se utilizaron plasma de EvW (VWD-P, George King), plasma humano normal (0,1 U/ml diluido en plasma de EvW, PHN), FvWr (0,1 U/ml diluido en plasma de EvW) y FvWr digerido *in vitro* (1 nl diluido en plasma de EvW, control de degradación). El dímero de 176 kDa no era detectable en la muestra previa al tratamiento, pero era claramente

distinguible en las muestras tomadas 15 minutos, 30 minutos y 1 hora después del tratamiento (véase la Figura 16A). Dado que este fragmento no estaba presente en el FvWr, la ADAMTS13 endógena del individuo tiene que haber dividido el FvWr administrado.

5 Durante un ensayo clínico en fase I, unos individuos con EvW de tipo III fueron tratados con 20 UI FvW:CoR/kg de peso corporal de FvWr (una dosis mayor que la arriba indicada). Se tomaron muestras de sangre antes del tratamiento y en varios momentos hasta 96 horas después del tratamiento y se analizaron en cuanto a la presencia de fragmentos de división de FvW dependiente de ADAMTS13.

10 Las muestras de plasma respectivas se aplicaron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras tal como se describe más arriba. El dímero de 176 kDa no era detectable en la muestra previa al tratamiento, pero era claramente distinguible en las muestras tomadas hasta 32 horas después del tratamiento (véase la Figura 16B). El fragmento de división específica por ADAMTS13 era distinguible en plasma mediante transferencia Western durante más tiempo debido a la mayor dosis de FvWr (20 frente a 7,5 UI/kg) administrada.

#### **Ejemplo 4: Detección de fragmentos de división de FvW después de proteólisis de FvW mediada por ADAMTS13 bajo tensión de cizalladura**

15 La división proteolítica de FvW inducida por cizalladura se llevó a cabo en un viscosímetro de cono-placa (HAAKE Rheo Stress 1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a un volumen total de 500  $\mu$ l, utilizando un cono de 60 mm (ángulo 0,5°). El diseño experimental estaba basado en una publicación de Shim et al. (Blood 111:651-657, 2008). El FvWr (concentración final 1 UI/ml) se mezcló con ADAMTS13r, ADAMTS13 derivada de plasma (ADAMTS13p) o  
20 plasma humano normal (concentración final 0,2 U/ml), en un tampón de reacción que contenía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1  $\mu$ M, y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH = 7,4. La reacción se inició sometiendo las muestras a una velocidad de cizalladura de 6.000 s<sup>-1</sup> a 37°C durante 15 minutos y se interrumpió por adición de EDTA (concentración final 5 mM). Unas muestras idénticas se incubaron de modo similar en ausencia de tensión de cizalladura como control negativo. El FvWr se incubó con ADAMTS13r bajo condiciones desnaturizantes (urea 1,5 M) durante 24 horas como control positivo.

25 Las muestras se aplicaron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras sobre geles de Tris-acetato al 3-8% (500 nl por pista) y a continuación se llevó a cabo una transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal de FvW antihumano de conejo marcado con PR (Dako) en combinación con una técnica de QA plus. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 17. El control de degradación marca la posición del dímero de 176 kDa, que se genera específicamente después de división de FvW por ADAMTS13. En las muestras sometidas a tensión de cizalladura se  
30 podían distinguir bandas de la misma movilidad. Por el contrario, el material inicial de FvWr y las muestras por lo demás idénticas mantenidas bajo condiciones estáticas no mostraban el fragmento de división específica.

La especificidad de la división de FvW por ADAMTS13 observada se analizó también mediante análisis multimérico. El FvWr (concentración final 3 UI/ml) se mezcló con ADAMTS13r (concentración final 5 U/ml) en un tampón de reacción que contenía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1  $\mu$ M, y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH = 7,4. La reacción se inició sometiendo la  
35 muestra a una velocidad de cizalladura de 6.000 s<sup>-1</sup> a 37°C durante 30 minutos y se interrumpió por la adición de EDTA (concentración final 5 mM). Una muestra idéntica se incubó de modo similar en ausencia de tensión de cizalladura como control negativo.

Los análisis multimérico de baja y alta resolución (véanse las Figuras 18A y 18B) mostraron que la ADAMTS13r inducía la degradación de FvWr y la formación de bandas satélite, resultando en un patrón similar al de plasma humano normal (NHP, George King). En la muestra mantenida bajo condiciones estáticas, pero por lo demás idénticas, no se observó  
40 ningún cambio relevante en el patrón multimérico.

Los datos combinados demuestran que, mediante el ensayo recientemente desarrollado, se logra y se puede medir la división de FvW dependiente de ADAMTS13 bajo las condiciones *in vitro* más parecidas a las condiciones fisiológicas en la circulación sanguínea.

45 Por tanto, este ensayo es también adecuado para medir la actividad de ADAMTS13 en muestras de plasma humano mediante la adición de FvWr como sustrato. Se pueden utilizar muestras de plasma con una amplia gama de niveles de actividad de ADAMTS13.

#### **Ejemplo 5: detección del efecto de ADAMTS13 recombinante en FvW endógeno en plasma**

50 El objetivo de este estudio es desarrollar adicionalmente el método de detección de productos de división por ADAMTS13 en plasma con el fin de detectar el efecto de ADAMTS13 recombinante (ADAMTS13r) inyectada en FvW endógeno en muestras humanas y de diferentes animales. Esto conducirá a un método para elegir el modelo más adecuado para estudios preclínicos de ADAMTS13r. Los métodos expuestos aquí más arriba se utilizan para analizar el

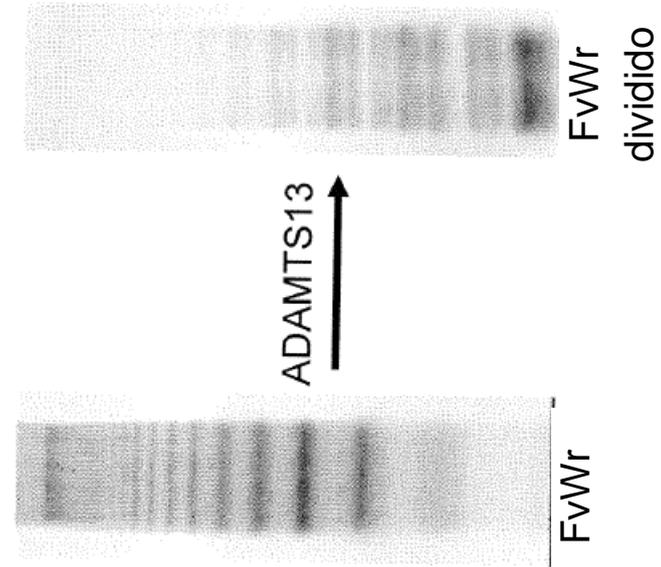
efecto de ADAMTS13r en la división de FvWr y FvW endógeno en el plasma de diversas especies de animales, incluyendo plasma humano.

5 La invención se ha descrito en términos de realizaciones particulares halladas o propuestas que comprenden modos específicos para la práctica de la invención. Para los expertos en la técnica serán evidentes diversas modificaciones y variaciones de la invención descrita sin salirse de su alcance y espíritu. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas, se ha de entender que la invención reivindicada no se debe limitar indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se considera que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son evidentes para los expertos en los campos pertinentes, están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

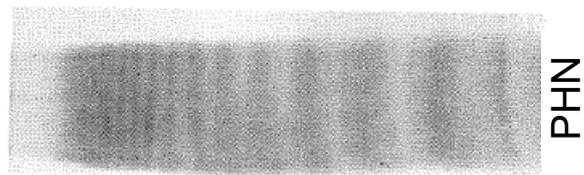
10

## REIVINDICACIONES

1. Método para analizar la eficacia de un factor de von Willebrand (FvW) utilizado en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EvW) en un individuo, que comprende medir fragmentos de división de FvW en una muestra de sangre del individuo antes y después del tratamiento, en el que un aumento de los fragmentos de división de FvW después del tratamiento indica que una desintegrina y metaloproteinasa con un motivo de trombospondina de tipo 1, miembro 13 (ADAMTS13) endógena en el individuo está dividiendo el FvW, y en el que una disminución o una ausencia de fragmentos de división de FvW después del tratamiento indica que la ADAMTS13 endógena en el sujeto no está dividiendo el FvW, y en el que los fragmentos de división de FvW son generados por la actividad de la ADAMTS13, y en el que la división de FvW se lleva a cabo bajo tensión de cizalladura.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la medida del nivel de fragmentos de división de FvW comprende realizar análisis por transferencia Western con un anticuerpo de FvW para visualizar fragmentos de división de FvW.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el análisis por transferencia Western se lleva a cabo bajo condiciones no reductoras.
4. Método según la reivindicación 2, en el que los fragmentos de FvW se visualizan empleando un anticuerpo de FvW conjugado con un marcador.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el marcador es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.
6. Método según la reivindicación 4, en el que el marcador se detecta con quimioluminiscencia aumentada.
7. Método según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo de FvW es monoclonal o policlonal.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los fragmentos de división de FvW se detectan en un nivel de sensibilidad de 0,025 a 0,5 Ag U/ml de FvW.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el cambio en el nivel de fragmentos de división de FvW se detecta midiendo el nivel de un fragmento o más de un fragmento de FvW de 140 kDa o un fragmento de FvW de 176 kDa.
10. Método según la reivindicación 1, en el que la tensión de cizalladura comprende una velocidad de cizalladura de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 s<sup>-1</sup>, a una temperatura de 20°C a 40°C, durante un período de tiempo.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la velocidad de cizalladura es de 1.000 s<sup>-1</sup> a 8.000 s<sup>-1</sup>.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la velocidad de cizalladura es de 6.000 s<sup>-1</sup>.
13. Método según la reivindicación 10, en el que la temperatura es de 30°C a 40°C.
14. Método según la reivindicación 13, en el que la temperatura es de 37°C.
15. Método según la reivindicación 10, en el que el período de tiempo oscila entre 30 segundos y 1 hora.
16. Método según la reivindicación 15, en el que el tiempo oscila entre 15 minutos y 30 minutos.
17. Método según la reivindicación 16, en el que el tiempo es de 30 minutos o es de 15 minutos.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que la muestra de sangre es plasma o suero.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el individuo es un mamífero.
20. Método según la reivindicación 19, en el que el individuo mamífero es un humano, un conejo, un mono, un perro, una rata, un ratón o un cerdo.



**FIG. 1B**



**FIG. 1A**

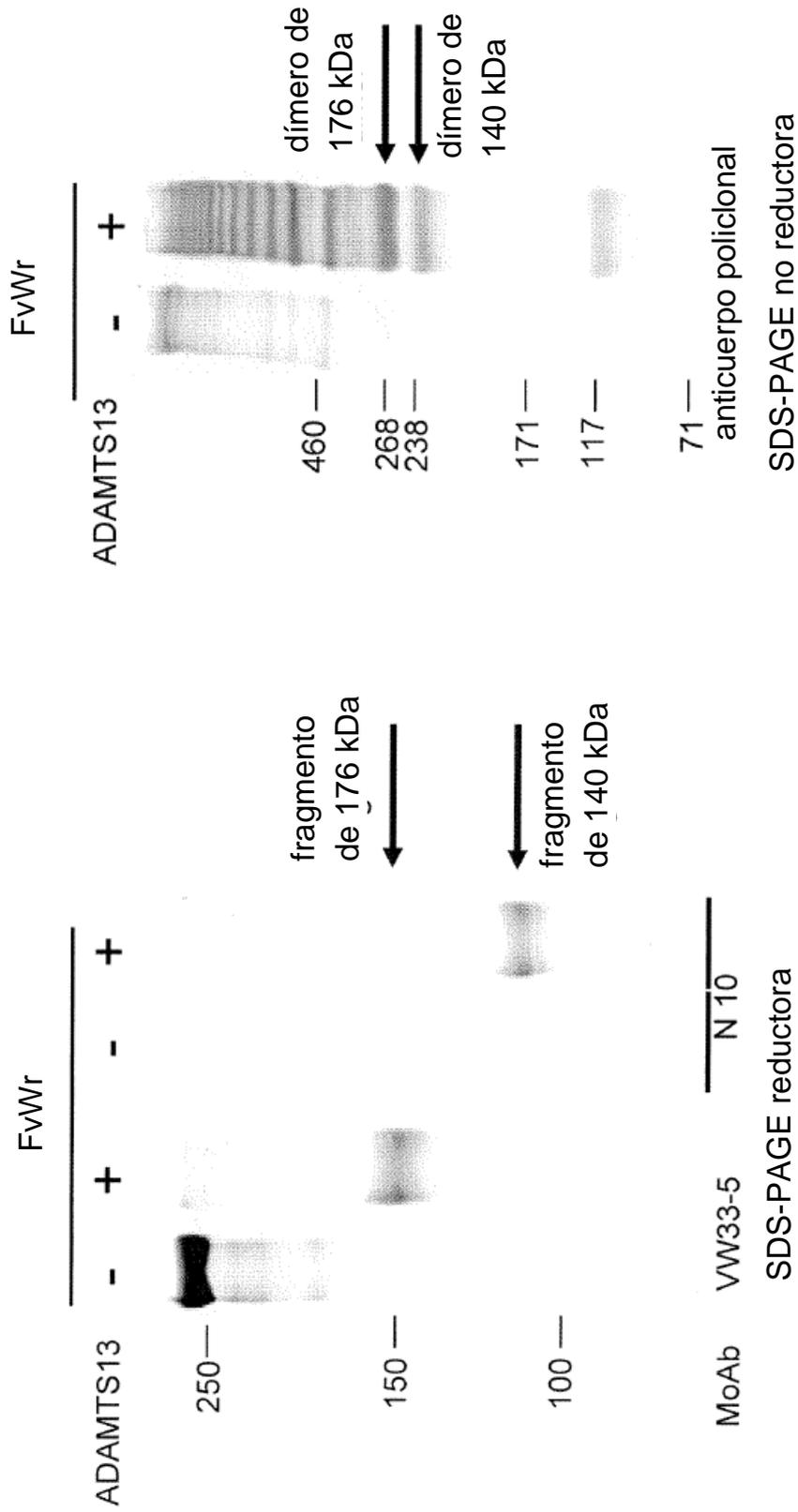


FIG. 2A

FIG. 2B

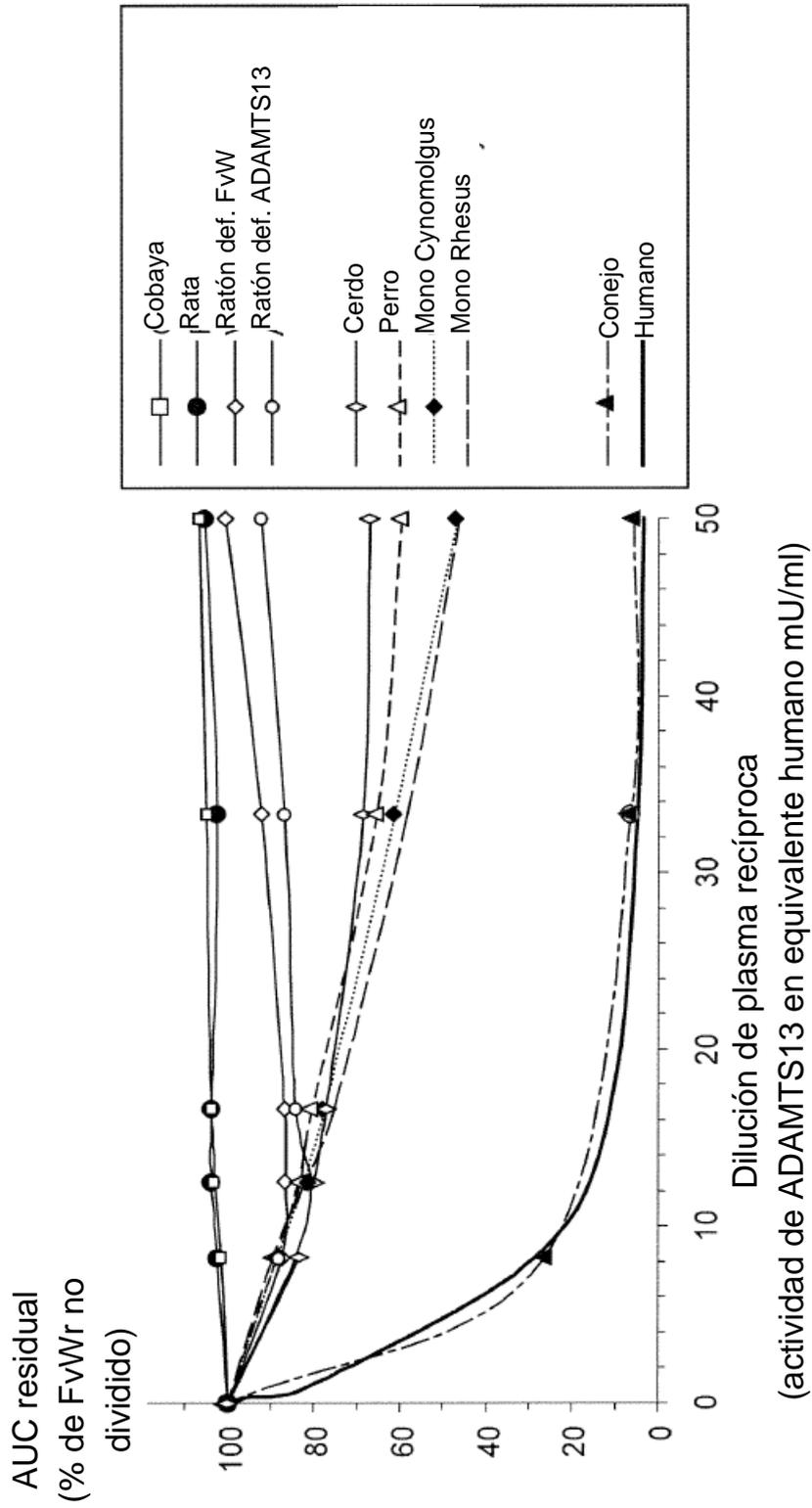
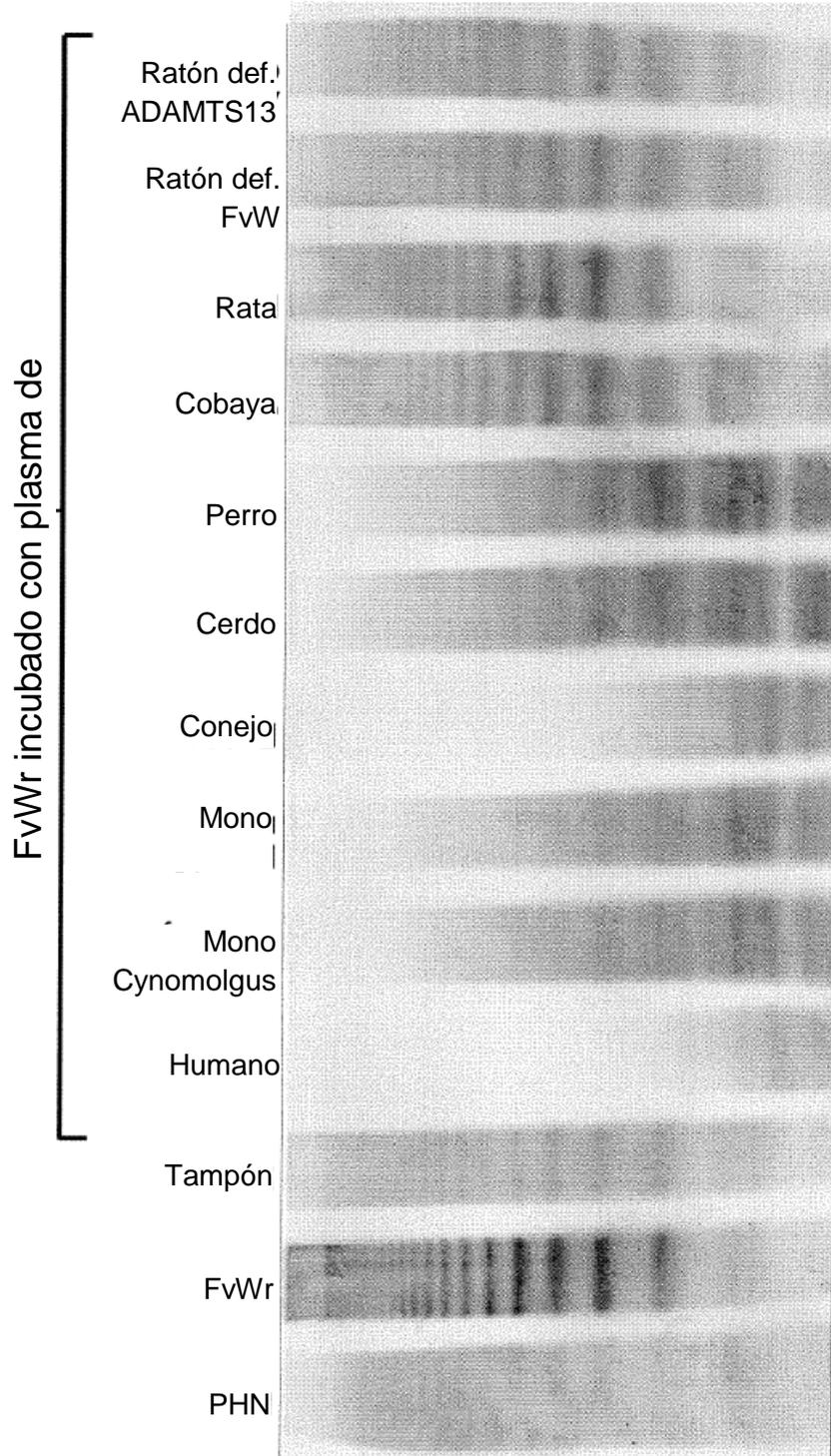


FIG. 3





**FIG. 5**

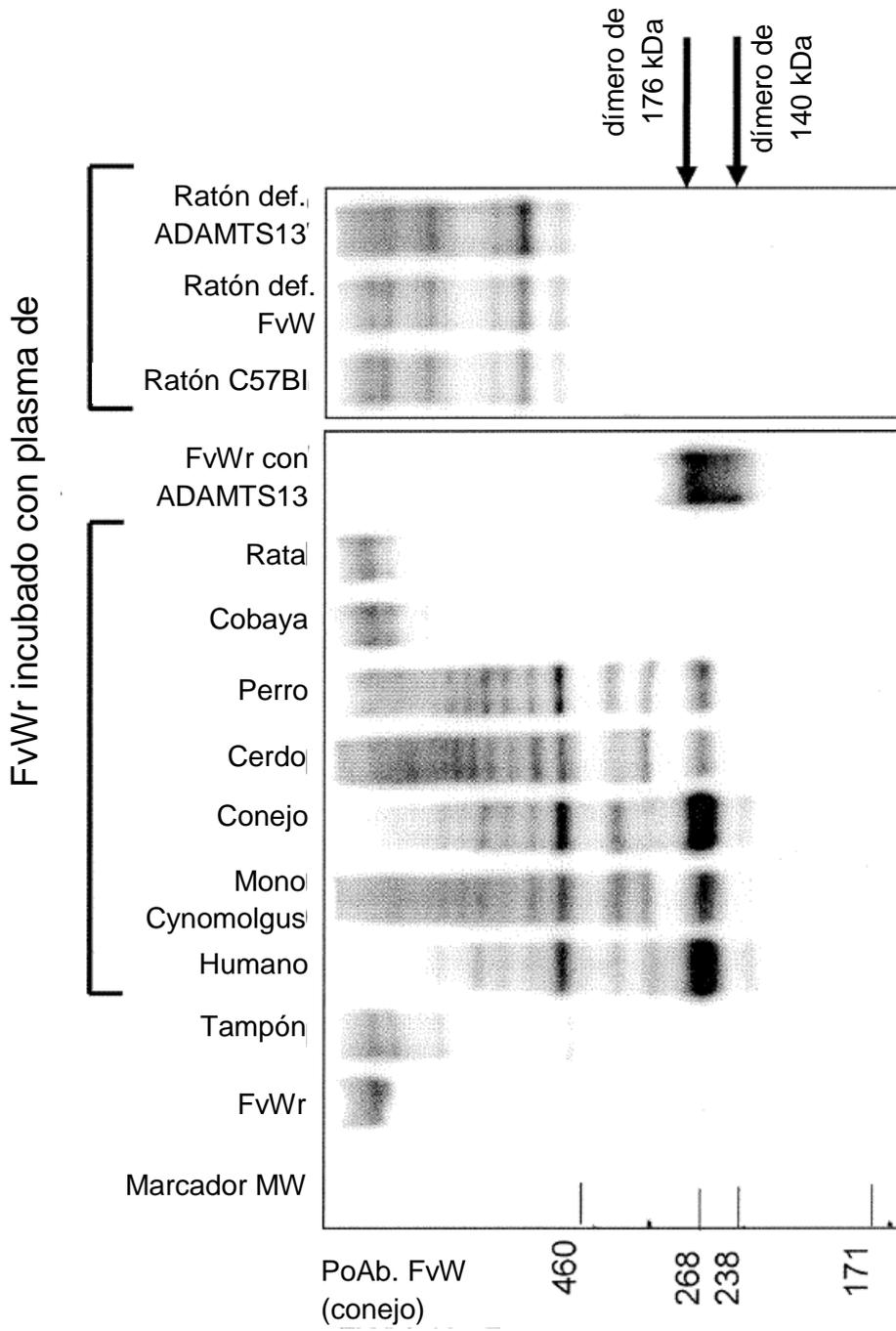
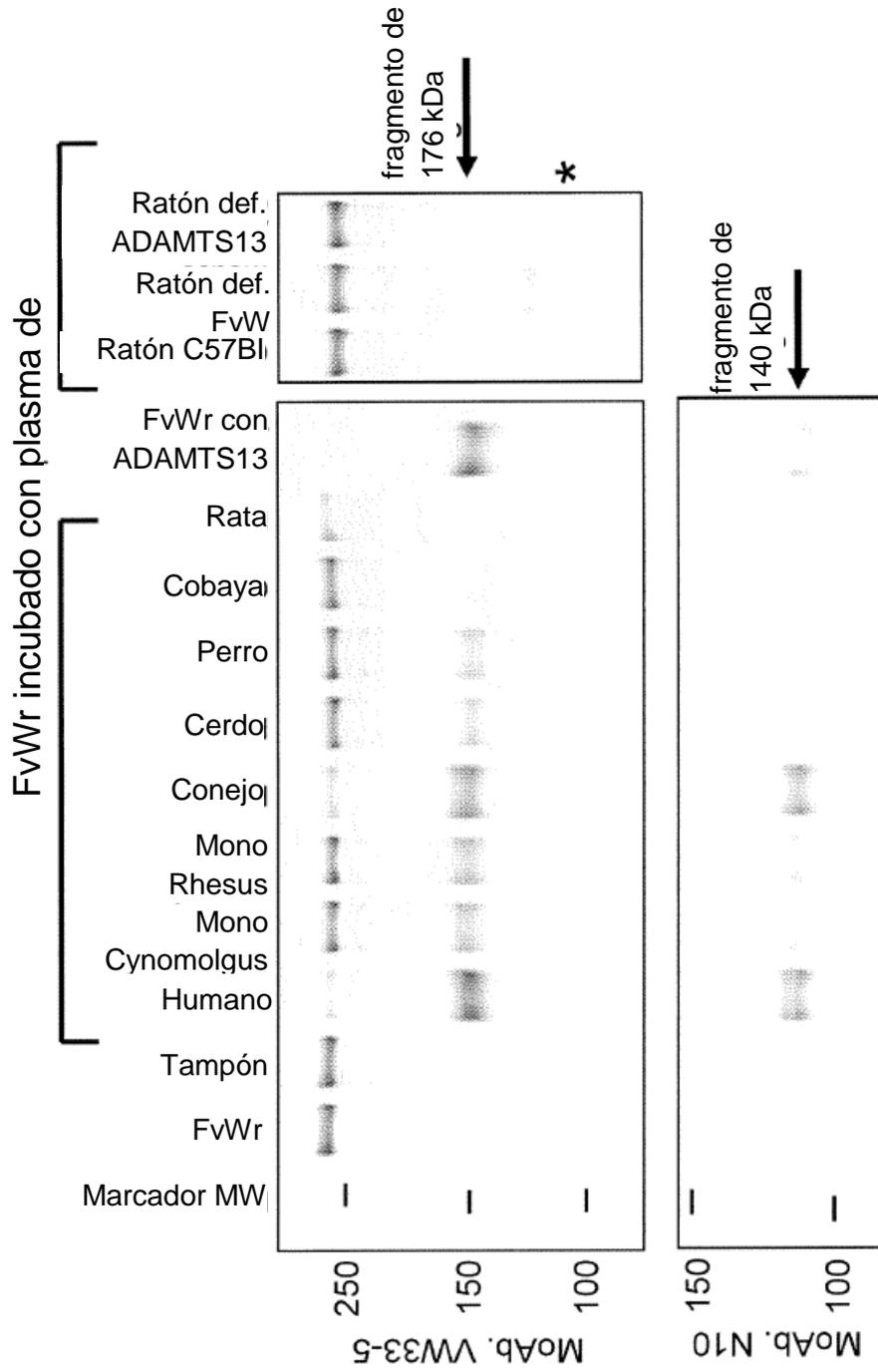


FIG. 6



**FIG. 7**

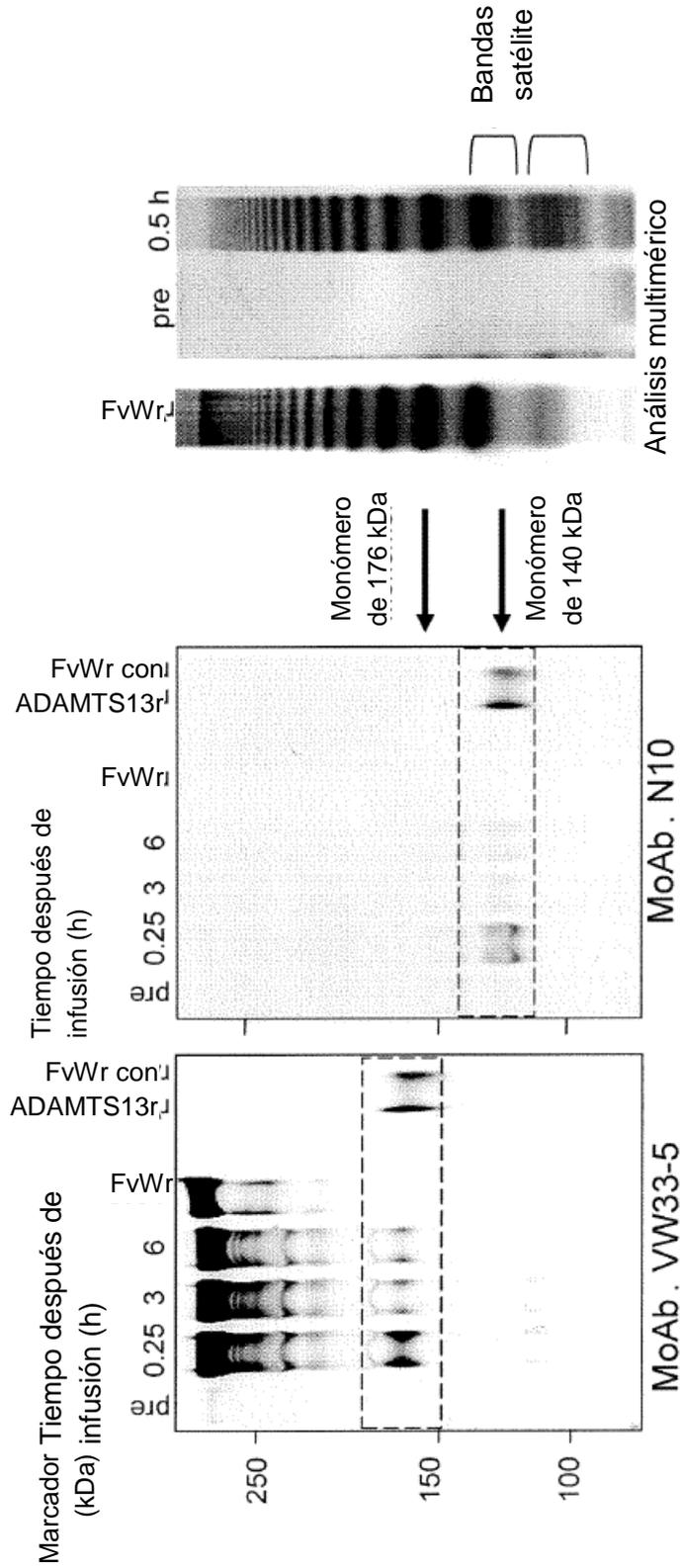
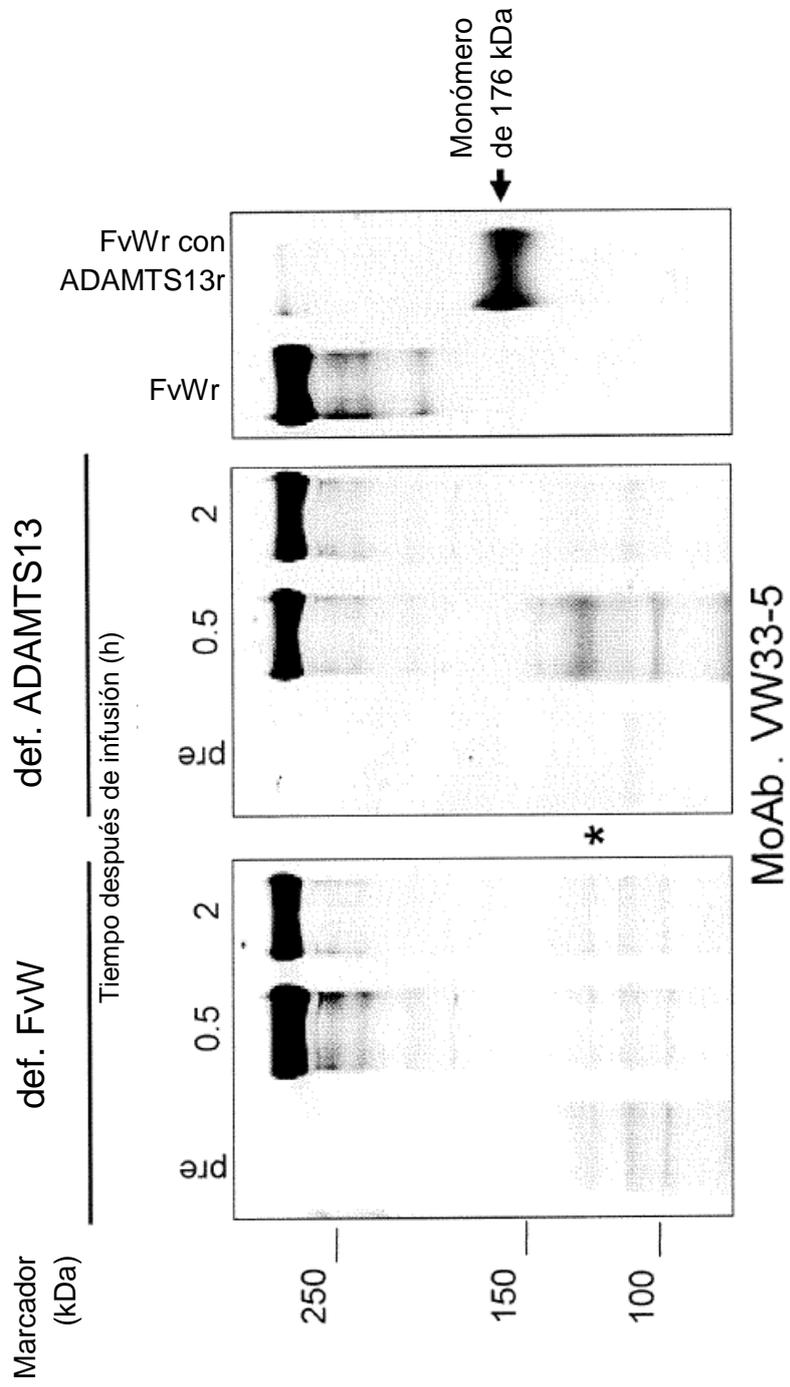


FIG. 8C

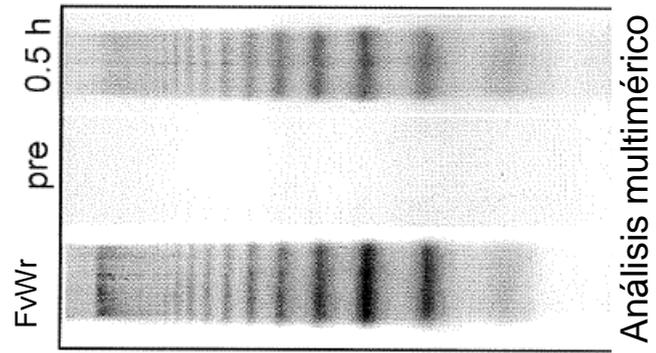
FIG. 8B

FIG. 8A

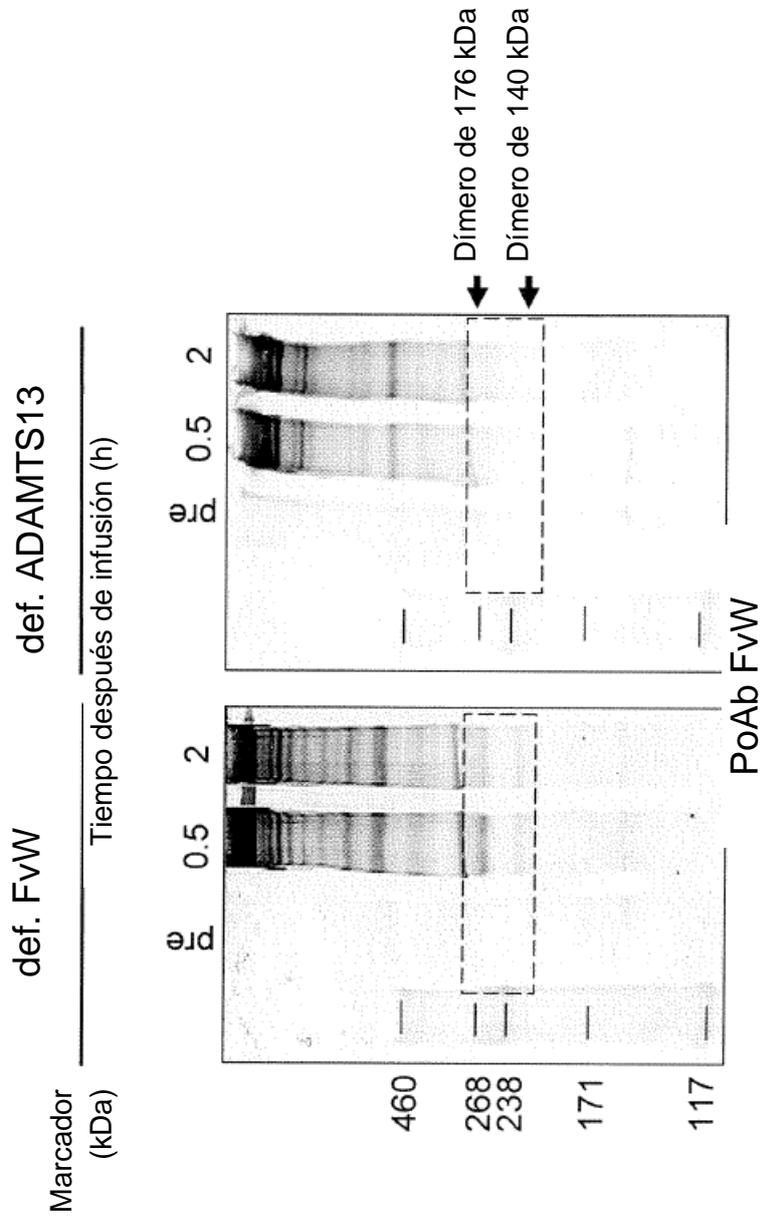


MoAb . VW33-5

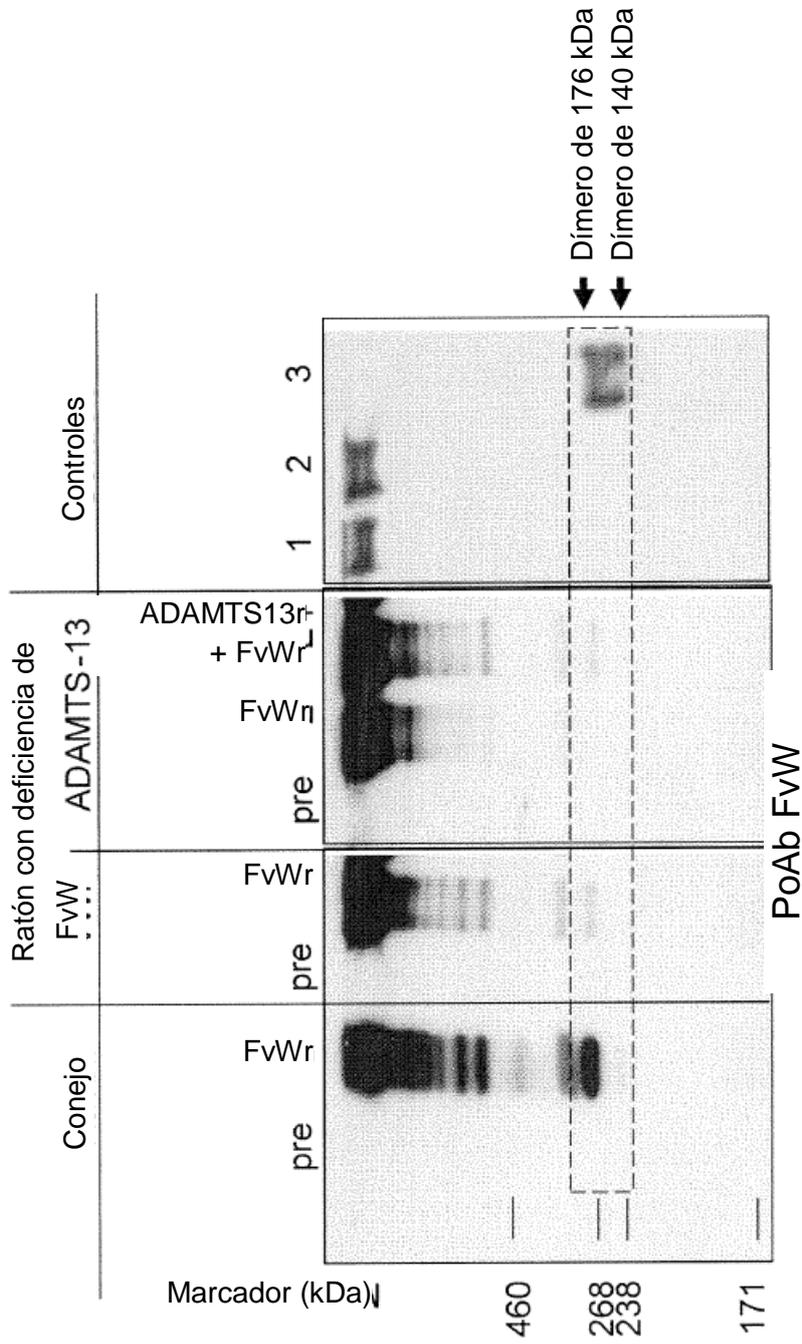
**FIG. 9A**



**FIG. 9B**



**FIG. 9C**



**FIG. 10**

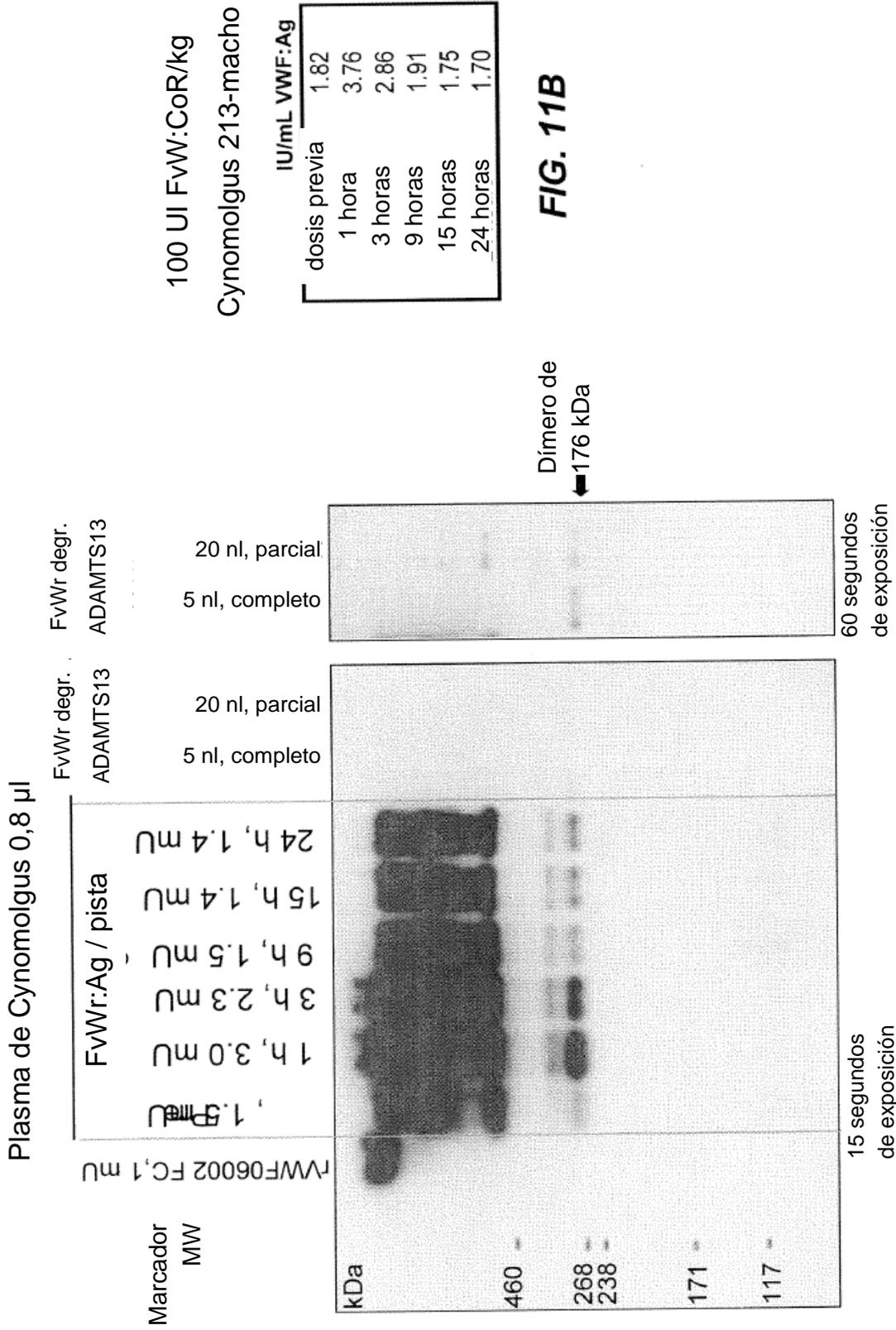
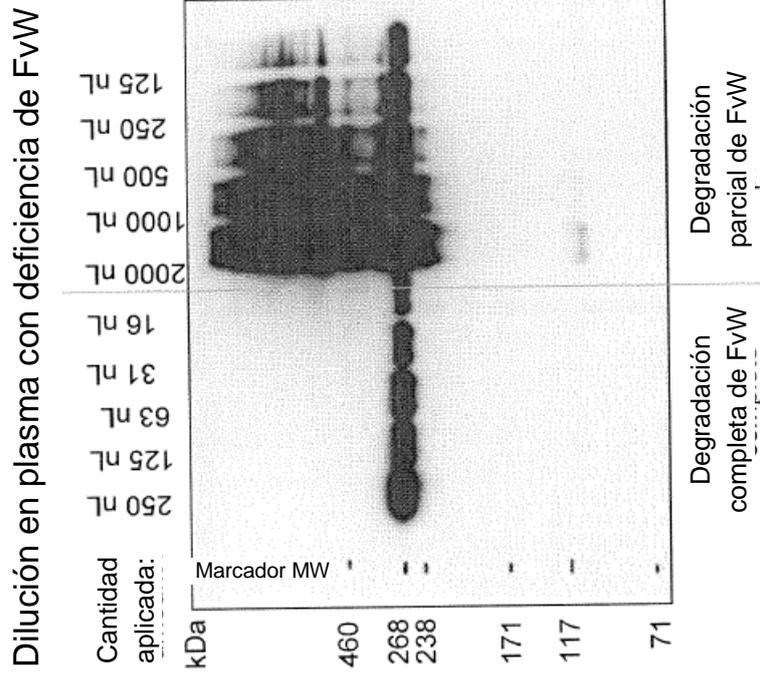
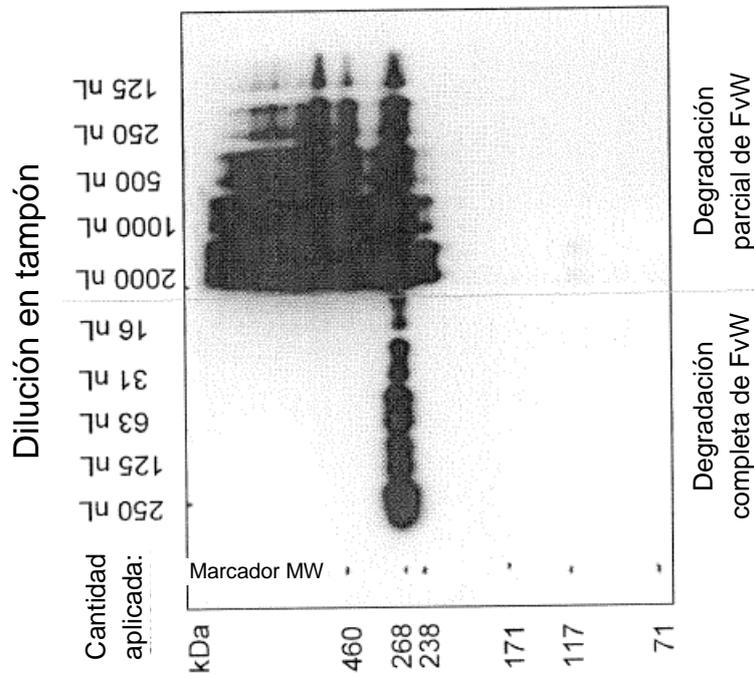


FIG. 11B

FIG. 11A



**FIG. 12B**



**FIG. 12A**

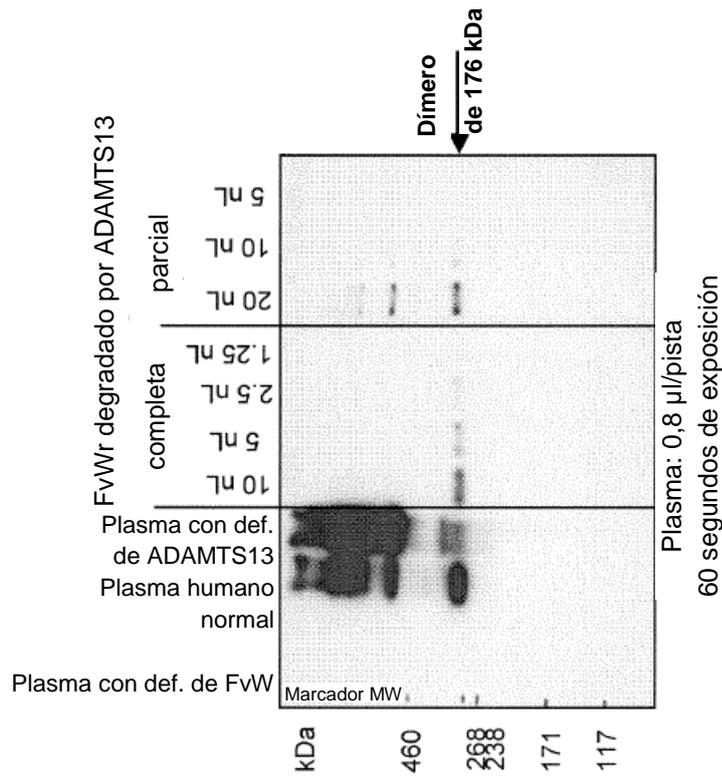


FIG. 13B

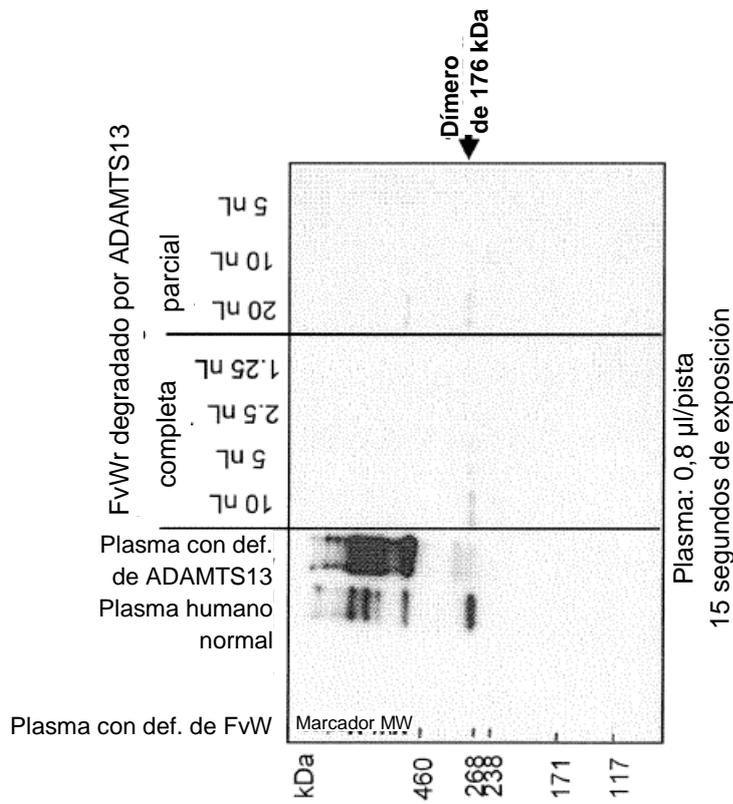
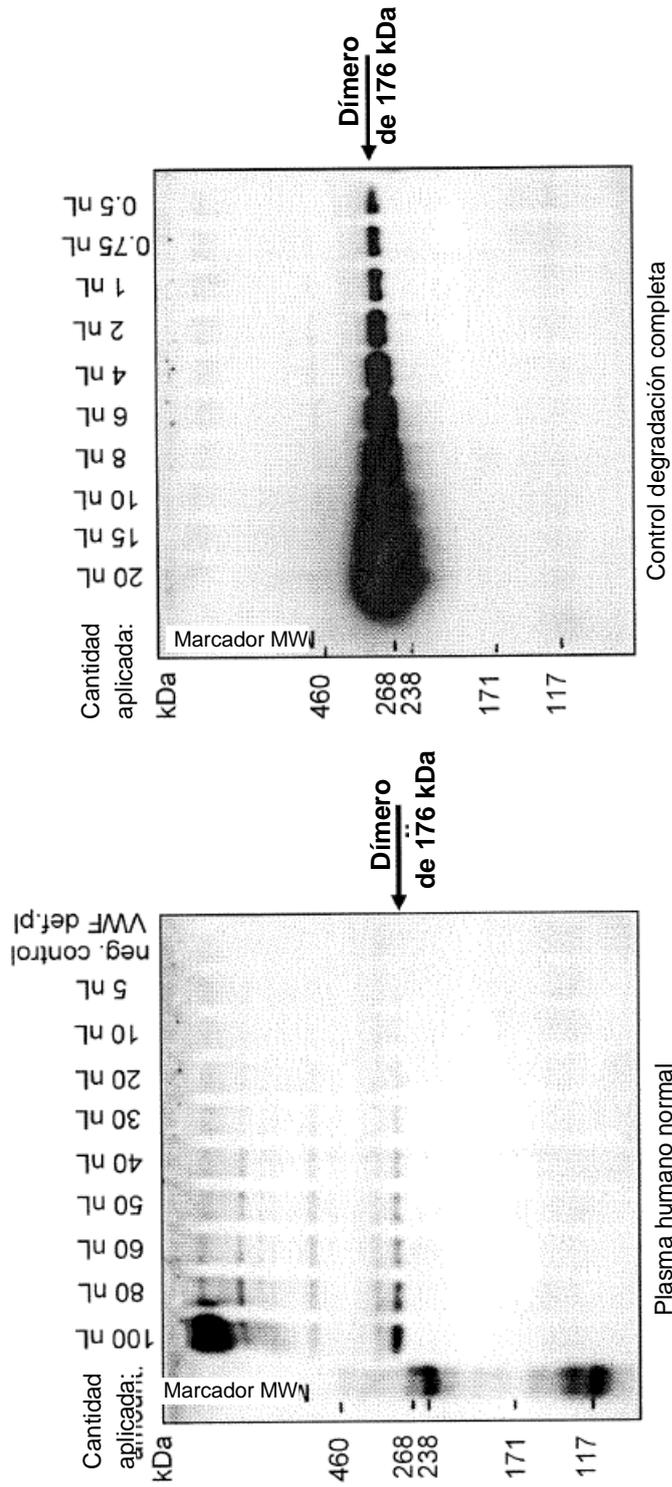
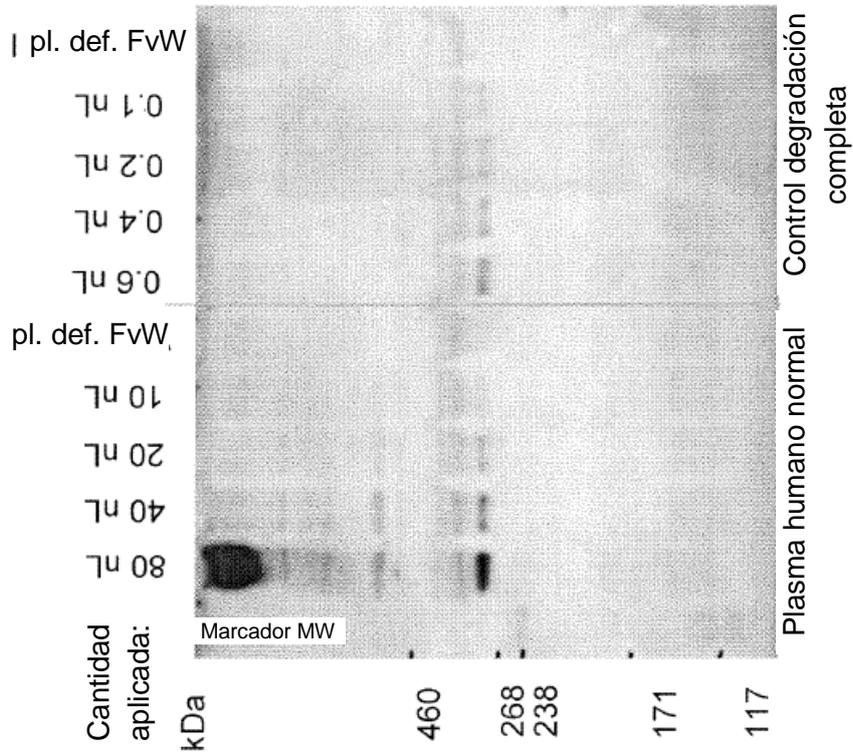
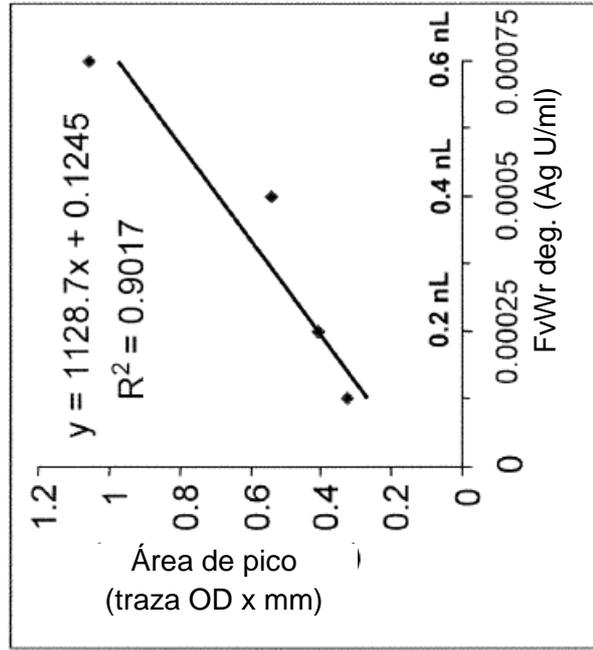


FIG. 13A

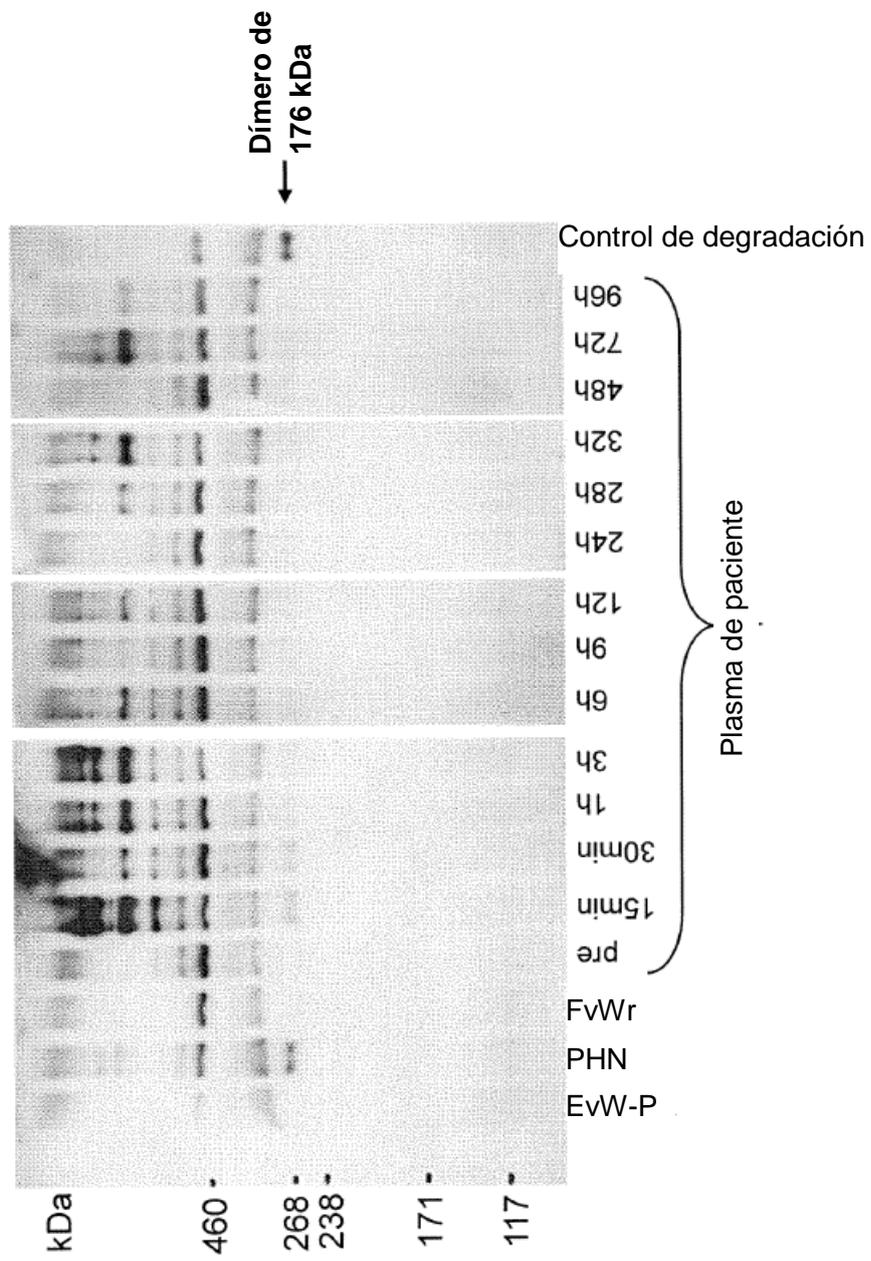




**FIG. 15A**



**FIG. 15B**



**FIG. 16A**

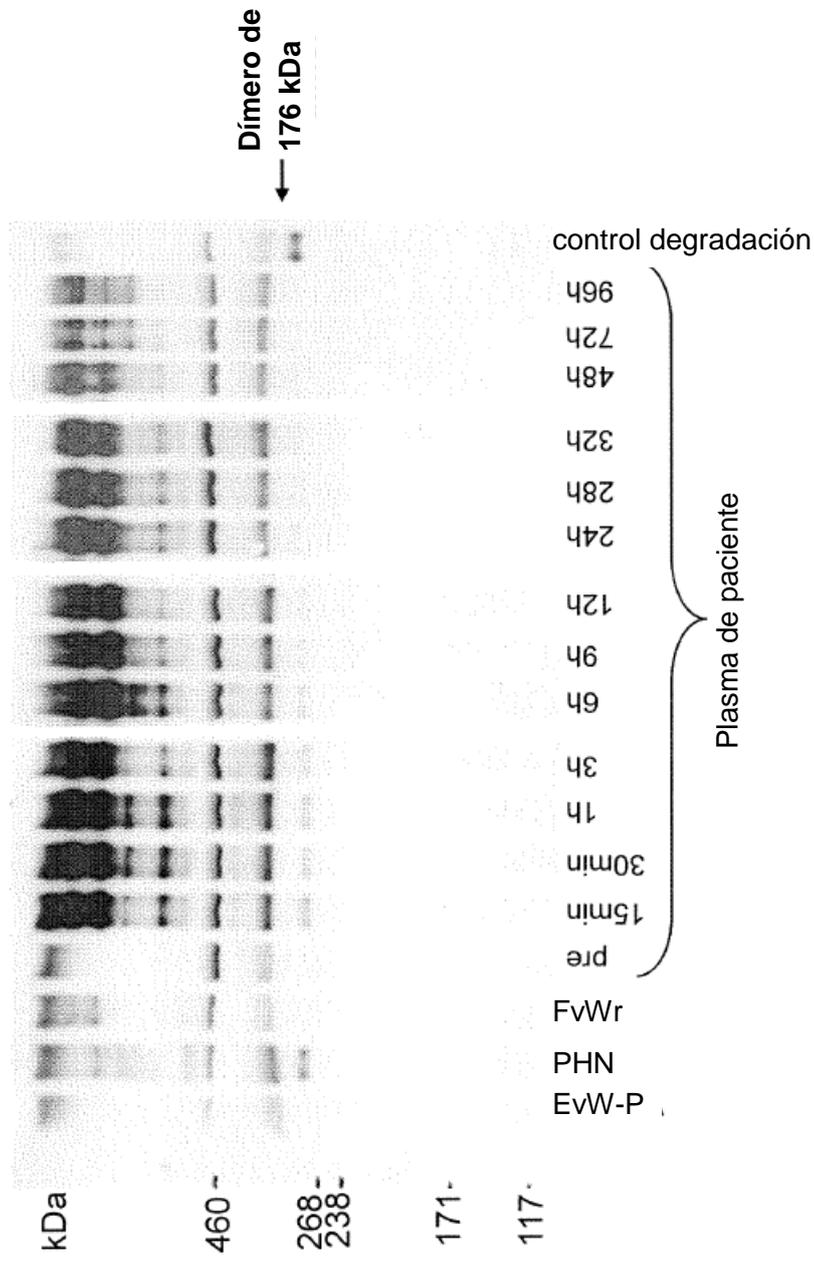


FIG. 16B

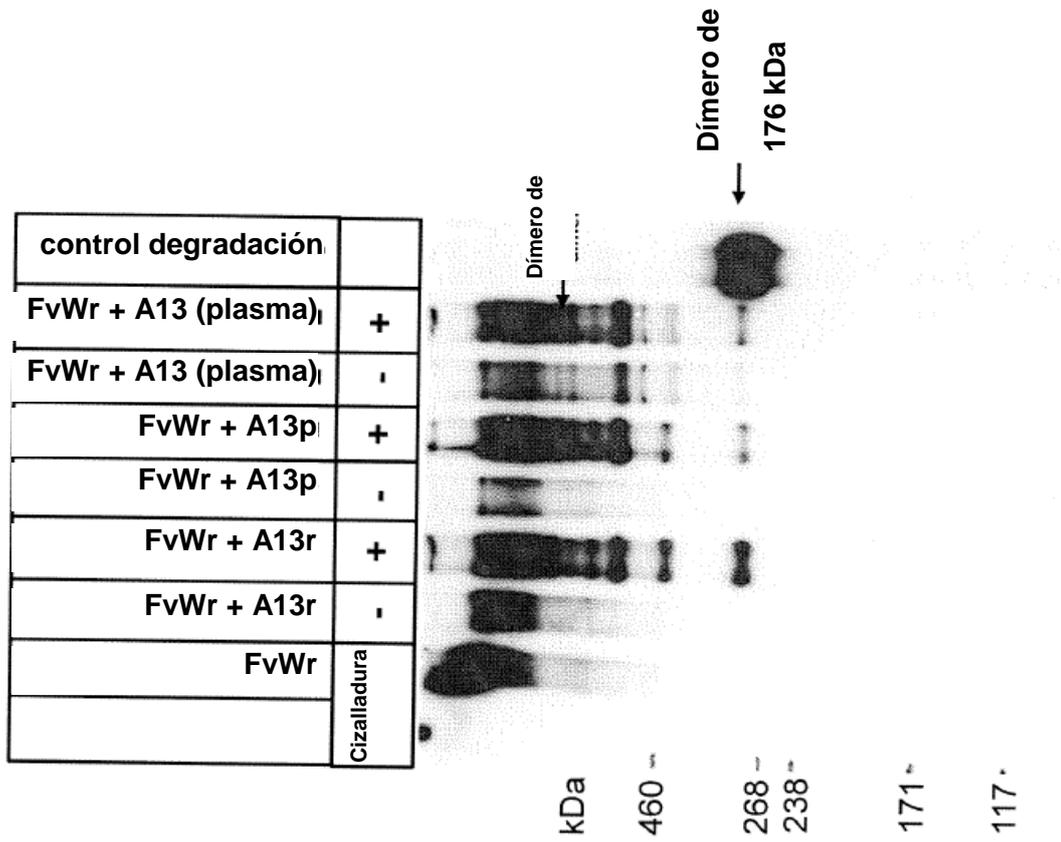


FIG. 17

Análisis multimérico  
Alta resolución

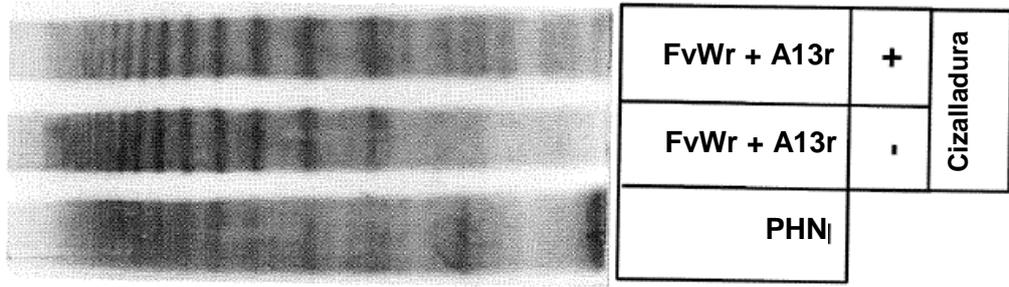


FIG. 18B

Análisis multimérico  
Baja resolución

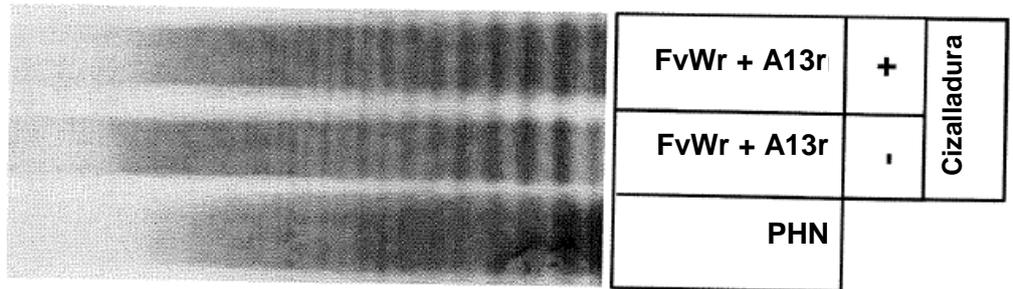


FIG. 18A