

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer:

**AT 407 992 B**

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 8037/99  
 (22) Anmeldetag: 25.02.1999  
 (42) Beginn der Patentdauer: 15.12.2000  
 (45) Ausgabetag: 25.07.2001

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12Q 1/56**  
 C12Q 1/37

(56) Entgegenhaltungen:  
 AT 403853B AT 404359B  
 BLOOD, 1996, VOL. 87, NO. 10, SEITEN  
 4223-4234

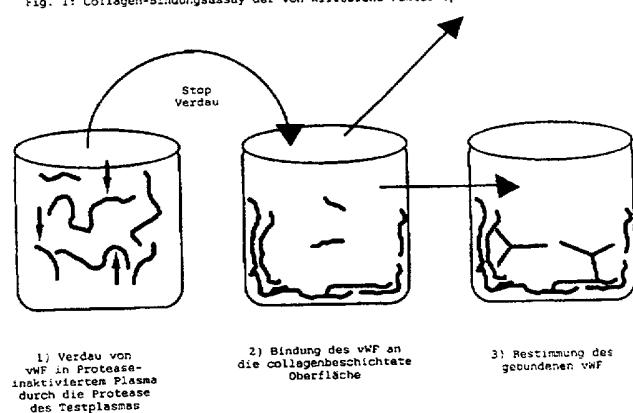
(73) Patentinhaber:  
 IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT  
 A-1221 WIEN (AT).  
 (72) Erfinder:  
 GERRITSEN HELENA E.  
 BERN (CH).  
 FURLAN MIHA  
 BERN (CH).  
 TURECEK PETER  
 KLOSTERNEUBURG, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
 VARADI KATALIN DR.  
 WIEN (AT).  
 SIEKMANN JÜRGEN DR.  
 WIEN (AT).  
 LÄMMLE BERNHARD  
 BOLLIGEN (CH).  
 SCHWARZ HANS-PETER  
 WIEN (AT).

(54) TESTKIT

**AT 407 992 B**

(57) Beschrieben wird ein Testkit zur Analytik der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease und zur Differentialdiagnostik zwischen Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura und Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom, bestehend aus einer von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat für die von Willebrand Faktor-spaltende Aktivität in einer Probe oder im Patientenplasma und einem System zur quantitativen Bestimmung der Bindung von von Willebrand Faktor an Collagen, sowie ein Verfahren zum Nachweis eines erworbenen oder kongenitalen Mangels der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease.

Fig. 1: Collagen-Bindungsassay der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease



Die vorliegende Erfindung betrifft einen Testkit und ein Verfahren zur Bestimmung der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease sowie die Anwendung des Verfahrens zur Differentialdiagnostik der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS).

5 Mangel an von Willebrand Faktor-spaltender Protease wurde bei Patienten mit TTP festgestellt, während Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) eine normale Aktivität der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease aufwiesen. Abgesehen von den bisher bereits beschriebenen verschiedenen aufwendigen Verfahren (Blood 1996; 87:4223) ist zur Zeit kein Bestimmungsverfahren der Aktivität der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease verfügbar. Ein einfaches Bestimmungsverfahren würde die Unterscheidung zwischen TTP und HUS erleichtern und so ein besseres Monitoring der Therapie von Patienten mit TTP erlauben.

10 Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein Testkit, bestehend aus einer von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat für die von Willebrand Faktor-spaltende Aktivität in einer Probe oder im Patientenplasma 15 und einem System zur quantitativen Bestimmung der Bindung von von Willebrand Faktor an Collagen die Analytik der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease und die Differentialdiagnostik zwischen Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura und Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom erstmals auf einfache Weise ermöglicht. Die von Willebrand Faktor-Standardpräparation kann dabei sowohl spezifisch hinsichtlich von Willebrand Faktor-spaltender 20 Protease inaktiviert sein, es kann dabei aber ebenso eine generell Protease-inaktivierte von Willebrand Faktor-Standardpräparation verwendet werden.

25 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Testkits erfolgt die quantitative Bestimmung der Collagen-Bindungsaktivität an immobilisiertem aviden Collagen, welches vorzugsweise an eine Mikrotiterplatte gebunden vorliegt.

25 Günstig ist dabei, wenn das immobilisierte Collagen kovalent gebunden ist.

Weiters ist dabei vorteilhaft, wenn das avide Collagen ein enzymatisch abgebautes, lösliches, 30 humanes Collagen ist.

Vorzugsweise ist die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein humanes Referenzplasma, bei welchem die von Willebrand Faktor-spaltende Proteaseaktivität inaktiviert ist.

Gemäß noch einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein rekombinanter von Willebrand Faktor ist.

Günstig ist auch, wenn die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein von Willebrand Faktor-Dimer ist.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung auch noch ein Verfahren zum Nachweis eines erworbenen oder kongenitalen Mangels der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease, wobei eine von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat mit der von Willebrand Faktor-spaltenden Aktivität des Patientenplasmas oder Verdünnungen desselben in Kontakt gebracht wird und nach Inkubation die quantitative Detektion des residualen von Willebrand Faktors durch seine Bindungseigenschaften an Collagen erfolgt.

40 Die beiliegenden Abbildungen zeigen das erfindungsgemäße Testprinzip und die Anwendung zur Diagnostik von Patientenplasmen. Die Übereinstimmung der komplizierten SDS-Agarose gel-elektrophoretischen Qualifizierung mit anschließendem Immunblotting mit der quantitativen Methode des erfindungsgemäßen Collagen-Bindungstests (CBA) ist ebenfalls in den beiliegenden Abbildungen dargestellt.

45 Erfindungsgemäß wurden Verdünnungen von Patienten- und Normalplasmen mit Barium aktiviert und mit unverdünntem vWF-Substrat versetzt. Als Substrat wurde ein Protease-inaktiviertes Plasma benutzt. Nach zwei Stunden Verdauung in Anwesenheit von Urea wurde die Reaktion gestoppt und das Inkubationsgemisch auf eine ELISA-Platte gegeben, die zuvor mit Collagen beschichtet worden war. Die langen vWF-Multimere binden sehr stark an das Collagen, die kleinen 50 Moleküle kaum oder gar nicht. Der Überstand wird sodann verworfen und die vWF-Moleküle, die an das Collagen gebunden wurden, können mittels allgemein bekannter Verfahren des Standes der Technik detektiert werden, z.B. mit Hilfe Peroxidase-markierter Antikörper angefärbt werden.

Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Abbildungen näher erläutert.

55 Es zeigen:

- Fig. 1 das Prinzip des erfindungsgemäßen Kollagen-Bindungstests,  
 Fig. 2 die Wirkung der Protease mit vWF-spaltender Aktivität,  
 Fig. 3 die Wirkung der Protease mit vWF-spaltender Aktivität auf die vWF-Untereinheit,  
 Fig. 4 die Testkalibrierung,  
 5 Fig. 5 die Bestimmung der vWF-spaltenden Protease in Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura,  
 Fig. 6 die Bestimmung der vWF-spaltenden Protease in einem Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura während der therapeutischen Behandlung, und  
 10 Fig. 7 die quantitative Bestimmung der vWF-spaltenden Protease in gereinigten Plasmafraktionen.

In dem erfindungsgemäßen Test (Fig. 1) wird die unterschiedliche Affinität der verschiedenen langen vWF-Multimere ausgenutzt. Die langen Multimere haben eine sehr hohe Affinität zu Collagen, während die kleinen Moleküle keine oder nur geringe Affinität aufweisen.

Der vWF besteht aus verschiedenen langen Multimeren derselben Untereinheit. Die Untereinheiten sind jeweils an den Carboxy- und an den Aminotermini durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (Fig. 2). Jede Untereinheit kann bei Tyrosin842-Methionin843 durch die vWF-Protease gespalten werden (Fig. 3).

Unter diesen Bedingungen wurde mit verschiedenen Normalplasmaverdünnungen eine Eichkurve erstellt (Fig. 4). Auf der Y-Achse ist die Extinktion bei 492 nm aufgetragen, auf der X-Achse die Normalplasmaverdünnungen. Es wird angenommen, daß eine Verdünnung von Normalplasma von 1/20 einer Aktivität von 100% entspricht. Je mehr vWF-spaltende Protease im Gemisch vorhanden ist, desto stärker wird der vWF verdaut, desto weniger kann er an Collagen binden und um so kleiner wird die Extinktion.

In Fig. 5 sind die Untersuchungen an zwei Familien dargestellt, deren Mitglieder an hereditärer TTP leiden. Oben ist die Immunblotting-Methode, unten die Werte, die mit dem erfindungsgemäßen Collagen-Bindungsassay (CBA) erhalten wurden, dargestellt. Ganz links ist der Propositus, der homozygot defizient an vWF-spaltender Protease ist. Als nächster kommt der Bruder, ebenfalls homozygot defizient, die Schwester normal, beide Eltern obligatorisch heterozygot. Dort, wo man in der Immunblotting-Methode einen stark verdauten vWF sieht, erhält man auch im erfindungsgemäßen CBA einen Wert um 100%, dort wo das Substrat nicht verdaut wurde, konnte auch im erfindungsgemäßen CBA keine Aktivität festgestellt werden. Rechts sind Mitglieder derselben Familie, die alle homozygot defizient sind.

Außerdem wurden auch Plasmen eines Patienten mit hereditärer TTP während der Therapie mit FFP untersucht (Fig. 6). Oben ist wiederum die Immunblotting-Methode, unten sind die Werte, die mit dem erfindungsgemäßen CBA erhalten wurden, zu sehen. Ganz links ist eine Plasmaprobe aufgeführt, die vor der Therapie entnommen wurde. Die weiteren Proben sind nach einem ersten und einem zweiten Plasmaaustausch entnommen worden. Sowohl bei der Immunblotting-Methode als auch bei dem erfindungsgemäßen Collagen-Bindungsassay kann eine Zunahme der Aktivität nach dem ersten Austausch, ein weiterer Anstieg nach der zweiten und danach eine Abnahme der Aktivität beobachtet werden.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß es möglich ist, mit Hilfe des erfindungsgemäßen Collagen-Bindungsassays die Aktivität der vWF-spaltenden Protease auf einfache und schnelle Weise zu messen. Dadurch sollte die Diagnose und das Therapiemonitoring von Patienten mit TTP erleichtert werden.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Möglichkeit zur quantitativen Auswertung und die einfachere und vor allem kürzere Durchführbarkeit, die in der Akutdiagnostik der lebensbedrohlichen Krankheitsbilder von entscheidender Bedeutung ist. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Tests verwendet zur quantitativen Bestimmung des Proteasesubstrates von von Willebrand Faktor den Collagen-Bindungsassay gemäß AT 403 853.

Eine weitere Anwendung der vorliegenden Erfindung besteht in der quantitativen Bestimmung der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease bei der Reinigung und Charakterisierung als therapeutische Plasmafraktion oder zur Qualitätskontrolle von therapeutisch eingesetzten Vollplasmen. Dies wird durch das nachfolgende Beispiel (siehe Fig. 7) näher erläutert:

Die von Willebrand Faktor-spaltende Protease (Multimerase) wurde gemäß AT 404 359 teilweise gereinigt. Zur weiteren chromatographischen Reinigung wurde die Multimerasepräparation

auf eine Säule, gefüllt mit Fractogel® TSK AF-Orange (Merck), aufgetragen und mit einem Puffergradienten von pH 5,5 - pH 8,5 in einem Trispuffer (10 mM Tris, 10 mM Na<sub>3</sub>Citrat, 150 mM NaCl) eluiert. In den Fraktionen wurde die UV-Absorption bei 280 nm (Gesamtprotein) und die Collagen-Bindungsaktivität eines von Willebrand Faktor-Standards nach erfindungsgemäßer Inkubation mit den Fraktionen gemessen. Der Kehrwert der Collagen-Bindungsaktivität wurde in das Elutionsdiagramm eingetragen und zeigt, daß neben einem Teil der Proteaseaktivität, die sich im Säulendurchlauf (Fraktion 10-20) befindet, der Großteil der Aktivität zwischen Fraktion 33 und 38 eluiert werden konnte.

10

PATENTANSPRÜCHE:

1. Testkit zur Analytik der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease und zur Differentialdiagnostik zwischen Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura und Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom, bestehend aus einer von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat für die von Willebrand Faktor-spaltende Aktivität in einer Probe oder im Patientenplasma und einem System zur quantitativen Bestimmung der Bindung von von Willebrand Faktor an Collagen.
2. Testkit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung der Collagen-Bindungsaktivität an immobilisiertes avides Collagen erfolgt, welches vorzugsweise an eine Mikrotiterplatte gebunden vorliegt.
3. Testkit nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das immobilisierte Collagen kovalent gebunden ist.
4. Testkit nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das avide Collagen ein enzymatisch abgebaut, lösliches, humanes Collagen ist.
5. Testkit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein humanes Referenzplasma ist, bei welchem die von Willebrand Faktor-spaltende Proteaseaktivität inaktiviert ist.
6. Testkit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein rekombinanter von Willebrand Faktor ist.
7. Testkit gemäß Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein von Willebrand Faktor-Dimer ist.
8. Verfahren zum Nachweis eines erworbenen oder kongenitalen Mangels der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease, dadurch gekennzeichnet, daß eine von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat mit der von Willebrand Faktor-spaltenden Aktivität des Patientenplasmas oder Verdünnungen desselben in Kontakt gebracht wird und nach Inkubation die quantitative Detektion des residualen von Willebrand Faktors durch seine Bindungseigenschaften an Collagen erfolgt.

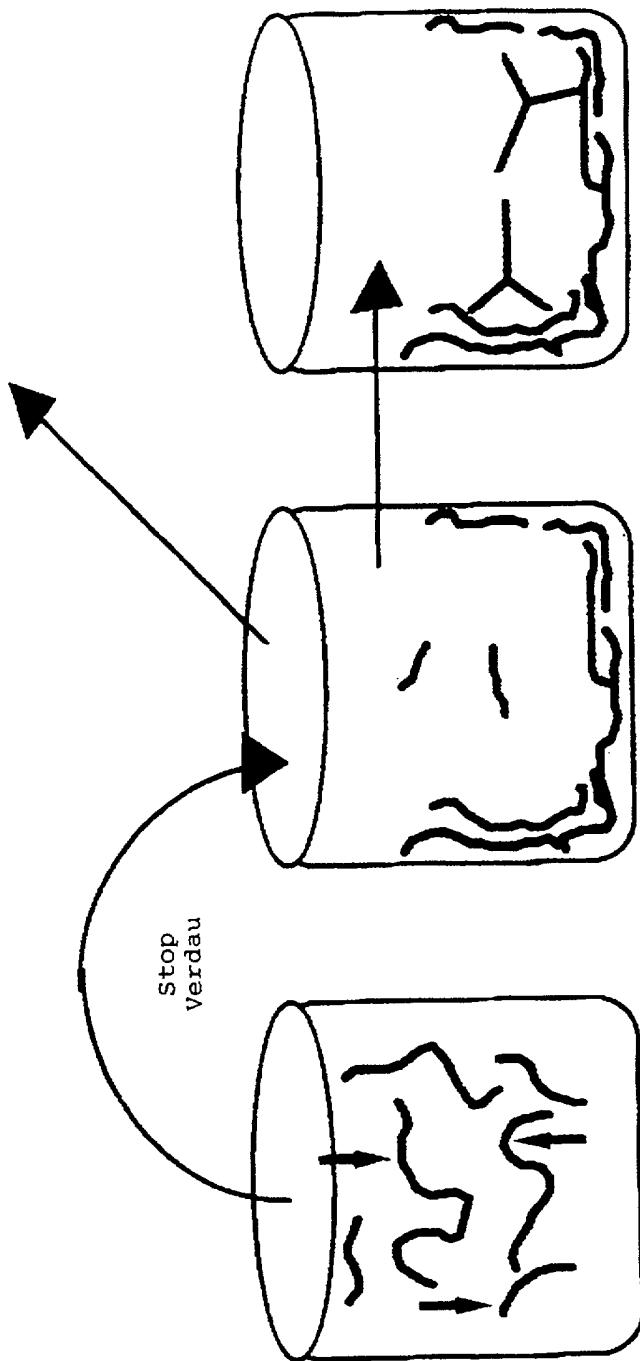
HIEZU 7 BLATT ZEICHNUNGEN

45

50

55

Fig. 1: Collagen-Bindungssassay der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease



- 1) Verdau von vWF in Protease-inaktiviertem Plasma durch die Protease des Testplasmas
- 2) Bindung des vWF an die collagenbeschichtete Oberfläche
- 3) Bestimmung des gebundenen vWF

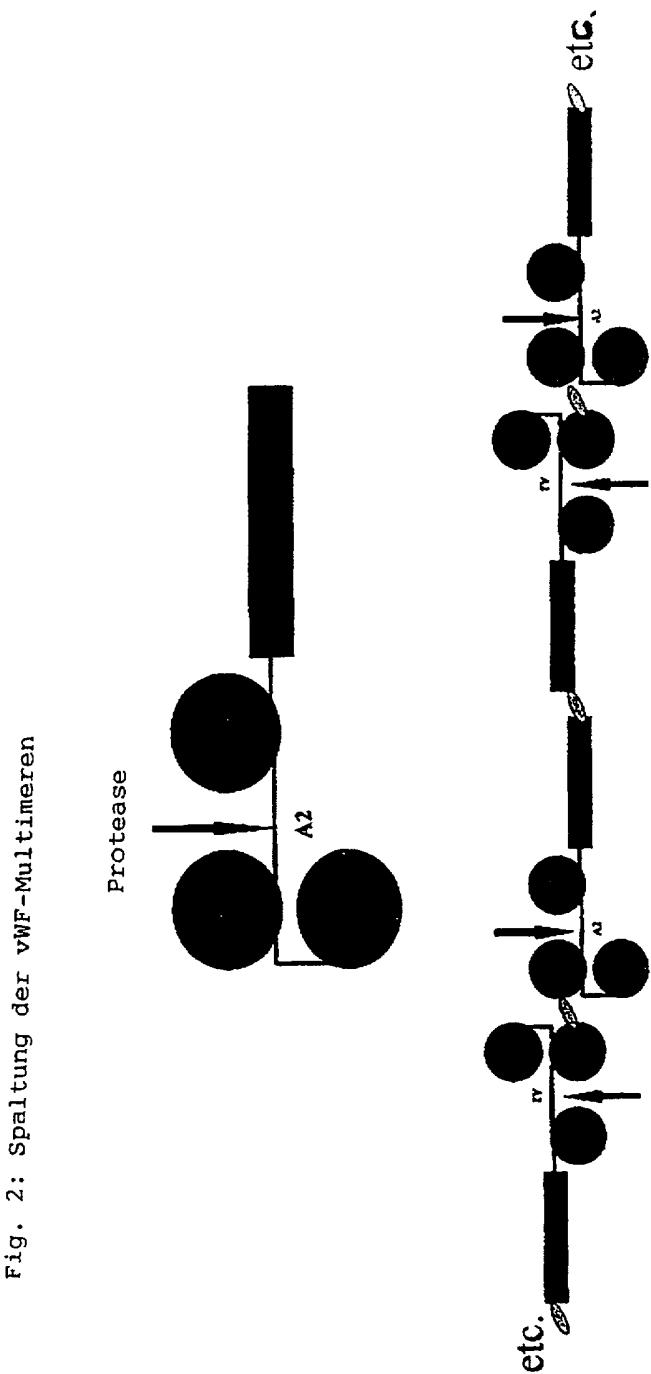


Fig. 3: vWF-Untereinheit mit Spaltungsstelle

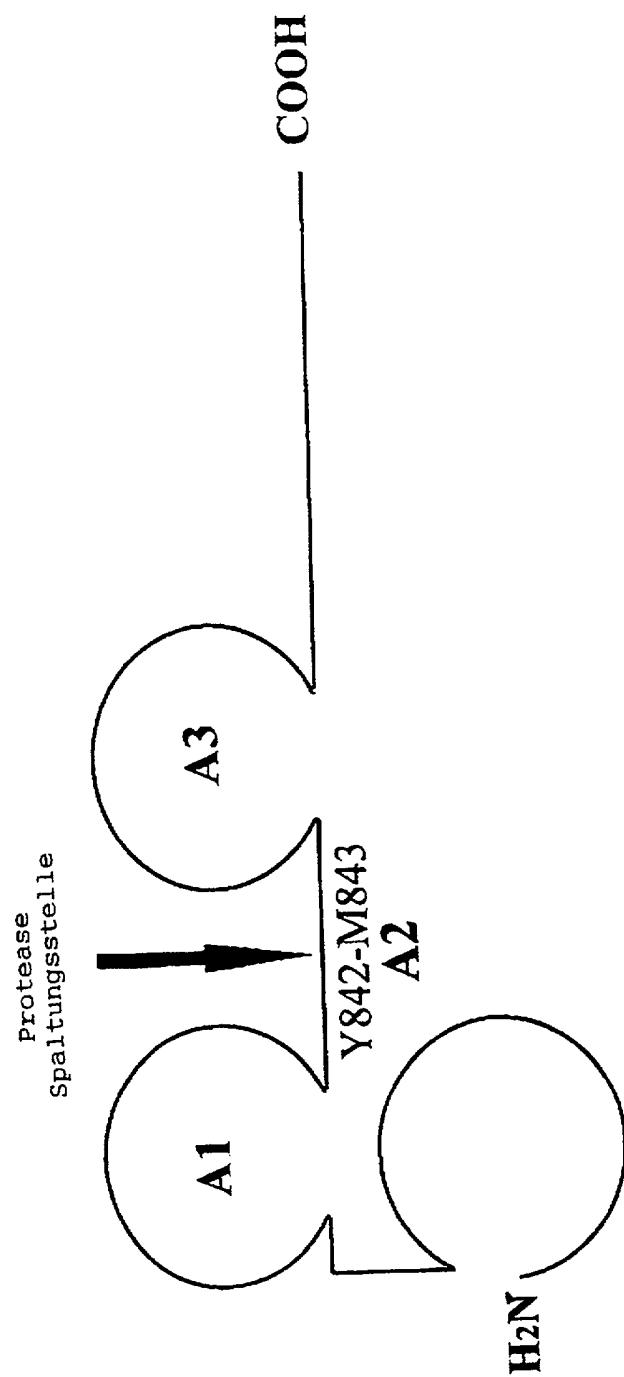


Fig. 4: Eichkurve mit humanem Normalplasma

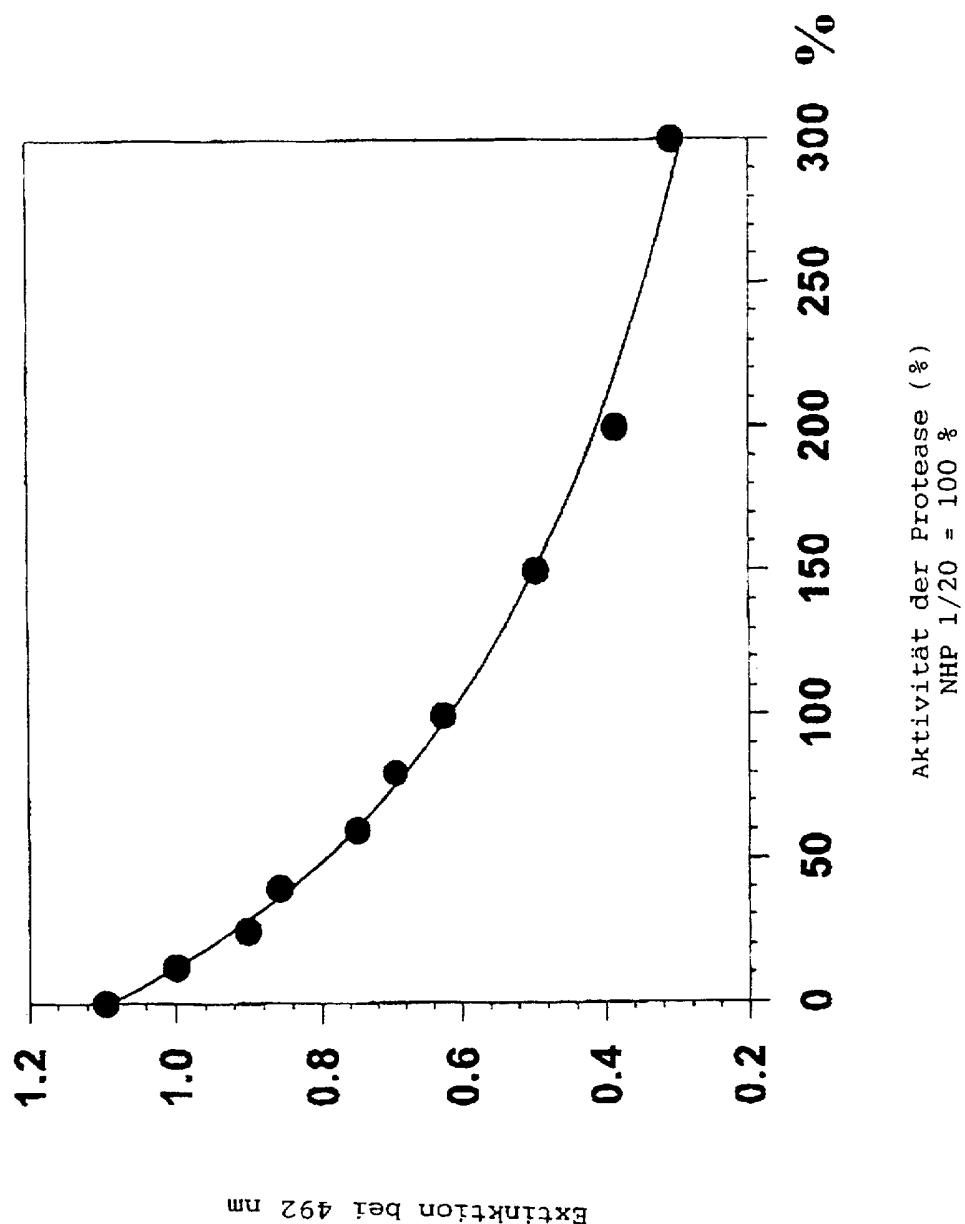


Fig. 5: Patienten mit hereditärer TPP

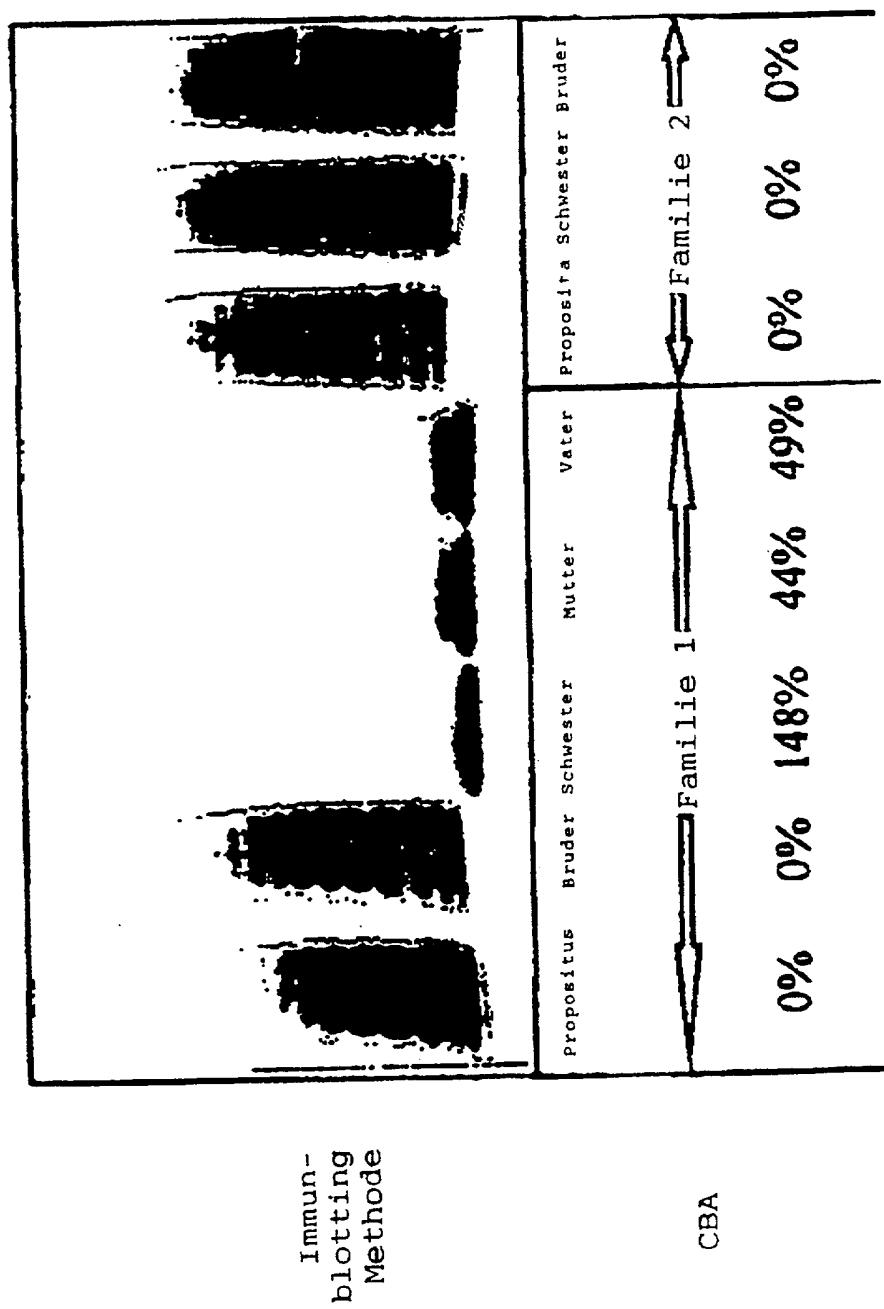
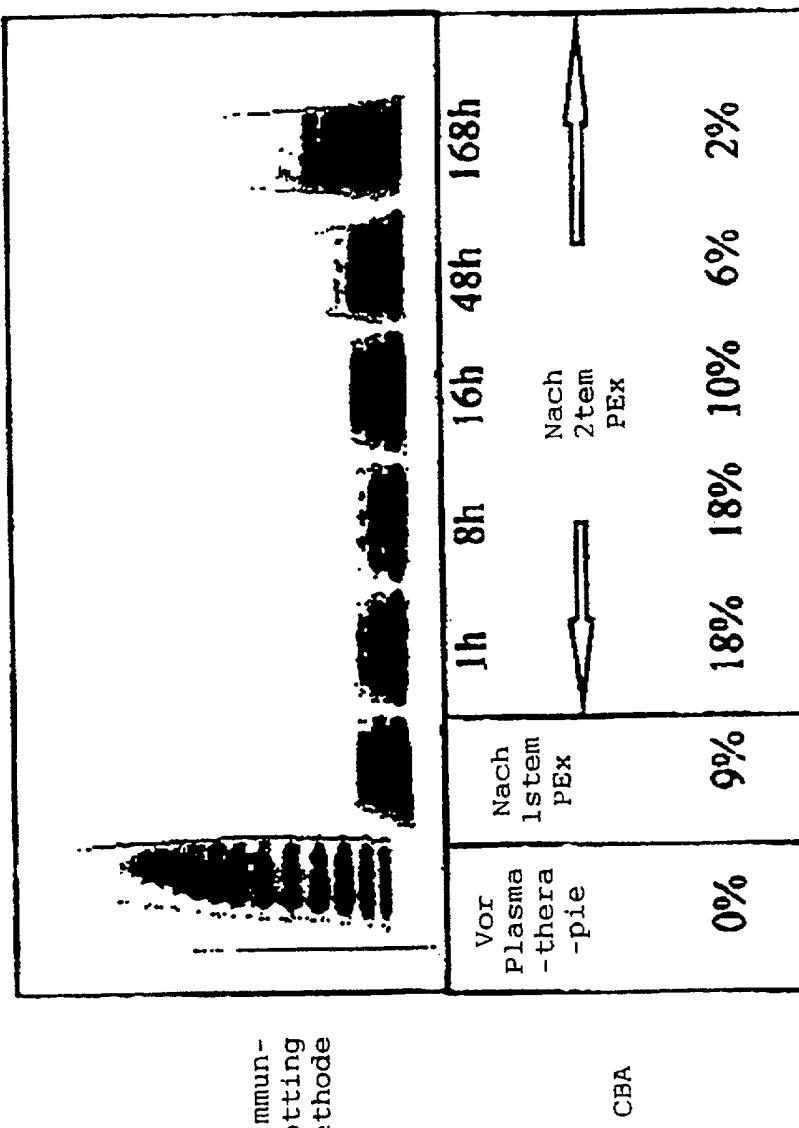


Fig. 6: Therapiemonitoring eines Patienten mit schwerer TRP



PEx = Plasmaaustausch

