

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2000.01.03**

(30) Prioridade(s): **1999.01.04 US 224785**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.03.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.07.30**
176/2014

(73) Titular(es):

DYAX CORP.

300 TECHNOLOGY SQUARE 8TH FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139

US

(72) Inventor(es):

BRIAN D. KELLEY

US

JINAN YU

US

DANIEL M. POTTER

US

JEFFREY S. DEETZ

US

JAMES E. BOOTH

US

(74) Mandatário:

ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA

AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA
PT

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO FACTOR VIII HUMANO E A PROTEÍNAS SEMELHANTES AO FACTOR VIII**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS MÉTODOS PARA DETECÇÃO DO FACTOR VIII HUMANO OU DE POLIPÉPTIDOS SEMELHANTES AO FACTOR VIII EM, E SEU ISOLAMENTO A PARTIR DE, SOLUÇÕES TAIS COMO SANGUE OU MEIO CONDICIONADO, JUNTAMENTE COM REAGENTES ADEQUADOS PARA O FIM COMPREENDENDO PORÇÕES DE LIGAÇÃO QUE RECONHECEM O FACTOR VIII HUMANO E/OU UM POLIPÉPTIDO SEMELHANTE AO FACTOR VIII E FORMAM UM COMPLEXO DE LIGAÇÃO COM ESTE. SÃO PARTICULARMENTE DIVULGADAS PORÇÕES DE LIGAÇÃO A POLIPÉPTIDOS PREFERIDAS.

DESCRIÇÃO

"MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO FACTOR VIII HUMANO E A PROTEÍNAS SEMELHANTES AO FACTOR VIII"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo do isolamento e purificação de proteínas. Especificamente, a presente invenção refere-se à identificação, ao isolamento e à síntese de moléculas de ligação que se ligam ao factor VIII e/ou a polipeptídeos semelhantes ao factor VIII. Tais moléculas de ligação são úteis para a detecção e purificação do factor VIII e polipéptidos semelhantes ao factor VIII a partir de soluções que os contenham.

ANTECEDENTES

A hemofilia A clássica é o resultado de uma deficiência ligada ao cromossoma X do factor VIII de coagulação do plasma sanguíneo e afecta quase exclusivamente indivíduos do sexo masculino com uma frequência de cerca de 1 caso para cada 10.000. O defeito do cromossoma X é transmitido por mulheres portadoras que não têm elas próprias a doença. O Factor VIII também é conhecido como factor anti-hemofílico (AHF), factor hemofílico A, cofactor de plaquetas, tromboplastinogénio, trombocitolisina, e globulina anti-hemofílica (AHG). A designação "factor VIII: C" é usada para indicar que é o composto que afecta a coagulação. O factor VIII é uma proteína de elevado peso molecular de 280 kDa e é constituída por duas cadeias polipeptídicas de 200 kDa e 80 kDa, respectivamente. Andersson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2979-2973

(1986). Estas cadeias são mantidas juntas através de uma ponte de ião metálico.

O principal sintoma de hemofilia A é o sangramento sem ou coagulação. Antes da descoberta de que a administração de concentrados de factor VIII pode aliviar os sintomas de um indivíduo diagnosticado com a doença, a esperança média de vida de um doente era de cerca de 20 anos.

Até há poucos anos, a maior fonte de factor VIII para fins terapêuticos era plasma sanguíneo normal; no entanto, o factor VIII isolado através deste método, embora útil, tem várias desvantagens importantes. Por exemplo, o factor VIII isolado a partir de plasma sanguíneo é bastante impuro, tipicamente com uma actividade específica de menos de 2 unidades de factor VIII/mg de proteína e um teor global de factor VIII de menos de 1%. Além disso, o processo de purificação é caro porque o material de partida, i.e., o plasma humano, é caro. Muitas precauções devem também ser tomadas para reduzir o risco de transmissão de agentes infecciosos para o paciente. Por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e outros agentes causadores de doenças são normalmente detectados em sangue doado. Outra desvantagem da utilização de factor VIII obtido através deste método é que aproximadamente um décimo dos pacientes com hemofilia A grave desenvolve anticorpos contra o factor VIII, tornando a doença difícil de tratar.

Os esforços de investigação têm-se centrado no desenvolvimento de métodos para a criação e o isolamento de factor VIII biologicamente activo, altamente purificado, nas formas inteira e derivadas. As vantagens de uma

proteína altamente purificada incluem níveis reduzidos de proteínas estranhas na mistura terapêutica, bem como uma diminuição da probabilidade da presença de agentes infecciosos. Uma forma mais purificada do factor VIII pode também ser administrada em doses mais pequenas, possivelmente reduzindo o risco de desenvolvimento de anticorpos anti-factor VIII, uma vez que doses menores seriam menos desafiadoras para o sistema imunitário.

Passos importantes foram tomados para a produção recombinante do factor VIII, começando com o isolamento de fragmentos de factor VIII biologicamente activos. Ver, Andersson *et al.*, Pat. U.S. No. 4,749,780; Andersson *et al.*, Pat. U.S. No. 4,877,614. O gene codificando a proteína inteira do factor VIII humano foi isolado tirando partido da sua homologia de sequência com o factor VIII de suíno. Ver, Toole *et al.*, Pat. U.S. No. 4,757,006. Toole *et al.* relatam também a expressão da proteína humana e suína possuindo actividade pró-coagulante de factor VIII:C.

No entanto, efeitos secundários graves envolvendo a produção de anticorpos anti-factor VIII existem ainda com a administração da proteína isolada a partir de ambas as fontes humana e não humana. Sabe-se que os anticorpos que reagem com o factor VIII:C humano reagem também, até certo ponto, com o factor VIII:C de outras espécies, e o factor VIII suíno é por si antigénico em humanos. Além disso, os não hemofílicos podem desenvolver ou adquirir a doença quando os seus sistemas imunitários se tornam sensibilizados para o factor VIII:C.

Como possível solução para este problema, uma proteína de menor peso molecular, truncada exibindo actividade pró-

coagulante foi concebida. Ver, Toole, Pat. U.S. No. 4,868,112. Toole relatou um método alternativo de tratamento com factor VIII suíno de menor peso molecular de aproximadamente 2000 aminoácidos exibindo actividade pró-coagulante semelhante à do factor VIII inteiro. Evidentemente, a remoção de certos aminoácidos e até 19 dos 25 possíveis locais de glicosilação, reduz a antigenicidade da proteína e, assim, a probabilidade de desenvolvimento de anticorpos anti-factor VIII. No entanto, uma dificuldade com o desenvolvimento de factor VIII recombinante é atingir níveis de produção em rendimentos suficientemente elevados.

Recentemente, foram desenvolvidas moléculas de ADNc do factor VIII suprimidas codificando para derivados de factor VIII recombinante, que era provável darem rendimentos suficientemente elevados de uma proteína recombinante de factor VIII biologicamente activo para uso num processo industrial para uma preparação farmacêutica. Ver, Almstedt *et al.*, Pat. U.S. No. 5,661,008. Almstedt *et al.* conceberam um factor VIII modificado derivado de um ADNc de factor VIII inteiro, que, quando expresso em células animais, produziu níveis elevados de uma proteína semelhante a factor VIII com actividade de factor VIII. A proteína consistiu essencialmente em duas cadeias polipeptídicas derivadas de factor VIII humano, as cadeias possuindo pesos moleculares de 90 kDa e 80 kDa, respectivamente. De acordo com o processo de Almstedt *et al.*, os ADNc de factor VIII são montados em unidades de transcrição e introduzidos num sistema hospedeiro adequado para expressão. As linhas celulares podem ser criadas em larga escala em cultura de suspensão ou num suporte sólido. A proteína produzida no meio de cultura é então concentrada e purificada. A proteína activa final é constituída pelos aminoácidos 1 a

743 e de 1638 a 2332 do factor VIII humano. Esta sequência polipeptídica é comercialmente conhecida como rFVIII-SQ ou REFACTO®. Ver também, Lind *et al.*, *Euro. J. Biochem.*, 232: 19-27 (1995). Podem também ser construídas outras formas de FVIII truncadas em que o domínio B está geralmente suprimido. Em tais formas de realização, os aminoácidos da cadeia pesada, consistindo essencialmente nos aminoácidos 1 a 740 do Factor VIII humano e possuindo um peso molecular de aproximadamente 90 kDa estão ligados aos aminoácidos da cadeia leve, consistindo essencialmente nos aminoácidos 1649 a 2332 do Factor VIII humano e possuindo um peso molecular de aproximadamente 80 kDa. As cadeias pesada e leve podem ser ligadas através de um péptido ligador de 2 a 15 aminoácidos, por exemplo um ligador compreendendo resíduos de lisina ou arginina, ou alternativamente, ligadas através de uma ligação de ião metálico.

Actualmente, há a necessidade no campo de métodos eficientes e económicos para a obtenção de factor VIII activo purificado directamente a partir de várias soluções, tais como sangue ou sobrenadantes de cultura celular.

A presente invenção proporciona novos materiais e métodos para a identificação, o isolamento, e purificação do factor VIII e de proteínas semelhantes ao factor VIII, incluindo REFACTO®, a partir de uma solução contendo tais proteínas, numa forma activa. As moléculas de ligação ao factor VIII da presente invenção exibem elevada afinidade para o factor VIII e péptidos semelhantes ao factor VIII. A presente invenção proporciona assim um meio económico para purificação rápida de quantidades comerciais de proteínas úteis no tratamento de hemofilia A.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Por conseguinte, é um objecto da presente invenção proporcionar novas moléculas de ligação ao factor VIII e proteínas semelhantes ao factor VIII. As moléculas de ligação da presente invenção preferidas exibem não só características distintas para ligação aos polipéptidos de factor VIII alvo como também características específicas e desejáveis para libertação (eluição) dos polipéptidos alvo. Moléculas de ligação especialmente preferidas de acordo com a invenção são sequências polipeptídicas curtas, caracterizadas por uma estrutura de volta estável.

Um método preferido é aqui divulgado para isolamento de moléculas de ligação de acordo com a invenção, empregando tecnologia de apresentação fágica. O método de apresentação fágica da presente invenção é útil para identificação de famílias de moléculas de ligação polipeptídicas, e usando esta técnica vários péptidos de ligação apresentando elevada afinidade para o factor VIII e péptidos semelhantes ao factor VIII foram identificados e isolados. Tais péptidos de ligação são úteis para identificação, isolamento e purificação de factor VIII, e polipéptidos semelhantes a factor VIII a partir de uma solução.

As moléculas de ligação específicas para o factor VIII e péptidos semelhantes ao factor VIII mais preferidas isoladas através do método de apresentação fágica da presente invenção são polipéptidos caracterizados por uma estrutura de volta formada como resultado de uma ligação dissulfureto entre dois resíduos de cisteína localizados nas posições divulgadas em SEQ ID NO:1. Moléculas de ligação polipeptídicas específicas incluem polipéptidos

compreendendo sequências de aminoácidos com a seguinte fórmula geral:

I. $X_1-X_2-Cys-X_3-X_4-X_5-X_6X_7-Cys-X_8-X_9$ (SEQ ID NO: 1),

em que X_1 é Arg, Phe, His ou Pro; X_2 é Ser, Gly, Leu ou His; X_3 é Gly, Asn, Ile ou Ser; X_4 é Ser, Trp ou Gly; X_5 é Trp, Ile, Leu ou Val; X_6 é Phe, Trp ou Ser; X_7 é Pro ou Phe; X_8 é Ser, Leu, Pro ou Phe; X_9 é Ala, Phe, Leu ou His.

Além disso, também está previsto que o método de apresentação fágica da presente invenção possa também ser utilizado para isolar outras famílias de moléculas de ligação específicas para o factor VIII e polipéptidos semelhantes ao factor VII.

As moléculas de ligação mais preferidas para isolamento e/ou purificação do factor VIII e de polipéptidos semelhantes ao factor VIII, incluindo especialmente REFACTO®, mencionado acima, a partir de uma solução incluem os seguintes polipéptidos;

Soluções a partir das quais o factor VIII e polipéptidos semelhantes ao factor VIII podem ser isolados e purificados incluem, mas não se limitam a, sangue, fracções de sangue, sobrenadantes de culturas de células recombinantes contendo factor VIII ou um polipéptido semelhante a factor VIII produzido e segregado pela célula hospedeira recombinante.

A presente invenção refere-se a um método para identificação e isolamento de moléculas de ligação ao factor VIII através de tecnologia de apresentação fágica. Mais especificamente, as moléculas de ligação a factor VIII

e semelhantes a factor VIII possuindo características de ligação e eluição específicas e predeterminadas podem ser seleccionadas a partir de uma biblioteca de moléculas de ligação, tal como uma biblioteca de apresentação fágica, através de um método compreendendo:

(a) a selecção de uma primeira condição de solução (i.e., as condições de ligação) a que se deseja que uma molécula de ligação deve exhibir uma afinidade para o factor VIII ou um polipéptido semelhante a factor VIII, formando um complexo de afinidade;

(b) a selecção de uma segunda condição de solução (i.e., as condições de libertação) a que se deseja que a molécula de ligação se dissocie do factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII, em que a segunda condição de solução é diferente em alguns aspectos, (p. ex., temperatura, pH, concentração de solvente, etc.) da primeira condição da solução;

(c) o proporcionar uma biblioteca de análogos de um domínio de ligação do factor VIII parental, em que cada análogo difere do referido domínio de ligação parental através da variação da sequência de aminoácidos numa ou mais posições de aminoácidos dentro do domínio;

(d) o contacto a referida biblioteca de análogos com o factor VIII ou um polipéptido semelhante a factor VIII na primeira condição de solução sob condições adequadas para formar um complexo entre a molécula de ligação e um factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII;

(e) a remoção a partir da solução dos membros não ligados (análogos) da biblioteca de domínios de ligação;

(f) a submissão dos complexos de factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII que restam do passo (e) à segunda condição de solução para dissociação de alguns dos

complexos de molécula de ligação/factor VIII (ou polipéptido semelhante a factor VIII);

(g) a recuperação dos análogos de ligação libertados sob a segunda condição de solução, em que os análogos recuperados identificam moléculas de ligação a factor VIII ou semelhantes ao factor VIII isoladas.

Opcionalmente, o procedimento acima pode incluir passos adicionais de condição de libertação, i.e., sujeitando opcionalmente os complexos do factor VIII ou de polipéptidos semelhantes a factor VIII que restam do passo (f) a uma terceira condição de solução para dissociar outros complexos restantes, que podem ser colhidos numa fracção separada das moléculas de ligação a factor VIII libertadas sob as segundas condições de solução. Um tal passo, se as condições forem suficientemente rigorosas para dissociar todos os complexos formados no passo (d), identificará as condições de solução adequadas para regeneração de matrizes de ligação utilizando as moléculas de ligação isoladas de acordo com este processo.

Também estão incluídas na presente divulgação moléculas de ligação não peptídicas e polipéptidos modificados que se ligam ao factor VIII e/ou a polipéptidos semelhantes a factor VIII. Um exemplo destas modificações é um péptido de volta constrangida possuindo resíduos de cisteína emparelhados que formam ligações dissulfureto, modificado nos resíduos de cisteína através da substituição de uma das cisteínas com aminoácidos não naturais capazes de condensação com a outra cadeia lateral de cisteína para formar uma ponte tioéter estável. Tais análogos tioéter cíclicos de péptidos sintéticos estão descritos na publicação PCT WO 97/46251, aqui incorporada por

referência. Outras modificações especificamente contempladas incluem substituições de aminoácidos específicos para dar estabilidade ou outras propriedades, sem afectar significativamente a ligação ao factor VIII, p. ex., substituição de Asp-Pro por Glu-Pro para reduzir a instabilidade em ácido); modificações N-terminais ou C-terminais para incorporar ligadores tais como segmentos poli-glicina e alterações para incluir grupos funcionais, nomeadamente funcionalidades hidrazida ($-\text{NH}-\text{NH}_2$), p. ex., para auxiliar na imobilização de polipéptidos de ligação de acordo com a presente invenção em suportes sólidos.

A presente divulgação engloba uma composição de matéria compreendendo ácidos nucleicos isolados, de preferência ADN, codificando as moléculas de ligação da presente invenção.

A presente divulgação proporciona um método para detecção de um factor VIII ou um péptido semelhante a factor VIII numa solução suspeita de o conter, compreendendo o contacto da solução com uma molécula de ligação e a determinação de se um complexo de ligação se formou.

A presente invenção refere-se a um método para purificação de factor VIII ou um polipéptido semelhante a factor VIII a partir de uma solução que o contenha, compreendendo os passos:

(a) contacto de uma solução contendo factor VIII ou um polipéptido semelhante a factor VIII com uma molécula de ligação de acordo com esta invenção sob condições de solução condutivas à formação de um complexo de ligação composto por factor VIII ou um polipéptido semelhante a factor VIII e a molécula de ligação;

- (b) separação dos complexos a partir dos componentes que não se ligam da solução;
- (c) dissociação do factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII a partir da molécula de ligação; e
- (d) colheita do factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII dissociado, purificado.

Está também previsto pela presente invenção um método para o isolamento de factor VIII e péptidos semelhantes a factor VIII compreendendo:

- (a) a imobilização de uma molécula de ligação de acordo com a invenção num suporte sólido,
- (b) o contacto de uma solução contendo factor VIII ou solução contendo polipéptido semelhante a factor VIII com o suporte sólido,
- (c) a remoção dos componentes que não se ligam da solução, e
- (d) a eluição do factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII a partir do suporte sólido.

DEFINIÇÕES

Tal como aqui utilizado, o termo "recombinante" é utilizado para descrever ácidos nucleicos não naturalmente alterados ou manipulados, células hospedeiras transfectadas com ácidos nucleicos exógenos, ou polipéptidos expressos não naturalmente, através da manipulação de ADN isolado e transformação de células hospedeiras. Recombinante é um termo que engloba especificamente moléculas de ADN que foram construídas *in vitro* utilizando técnicas de engenharia genética, e a utilização do termo "recombinante" como adjectivo para descrever uma molécula, uma construção, um vector, uma célula, um polipéptido ou um polinucleótido

exclui especificamente tais moléculas, construções, vectores, células, polipéptidos ou polinucleótidos de ocorrência natural.

O termo "bacteriófago" é definido como um vírus bacteriano contendo um núcleo de ADN e uma carapaça protectora construída pela agregação de várias moléculas proteicas diferentes. Os termos "bacteriófago" e "fago" são aqui utilizados indiferentemente.

O termo "polipéptido semelhante a factor VIII" é utilizado para referir uma forma modificada ou truncada de factor VIII natural ou factor VIII recombinante inteiro, polipéptido semelhante a factor VIII esse que mantém as propriedades pró-coagulantes do factor VIII. Exemplos de polipéptidos semelhantes a factor VIII são os fragmentos de factor VIII e derivados de factor VIII activos divulgados nas patentes de Andersson *et al.*, Toole, e Almstedt *et al.* citadas acima. O termo "factor VIII alvo" é por vezes utilizado abaixo para se referir colectivamente ao factor VIII e/ou polipéptidos semelhantes a factor VIII contidos numa solução ou numa corrente de alimentação de produção.

O termo "molécula de ligação" tal como aqui utilizado refere-se a qualquer molécula, polipéptido, peptidomimético ou célula transformada ("transformante") capaz de formar um complexo de ligação com outra molécula, polipéptido, peptidomimético ou transformante. Uma "molécula de ligação ao factor VIII" é uma molécula de ligação que forma um complexo com factor VIII. Exemplos específicos de moléculas de ligação ao factor VIII são os polipéptidos aqui descritos (p. ex., SEQ ID NO: 1-32) e bacteriófagos exibindo qualquer um de tais polipéptidos. Também estão

incluídos dentro da definição de moléculas de ligação a factor VIII os polipéptidos derivados de, ou incluindo, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de acordo com a fórmula I, II ou III, acima, e polipéptidos que tenham sido modificados para determinados resultados. Exemplos específicos de modificações contempladas são substituições de aminoácidos C-terminais ou N-terminais ou prolongamentos da cadeia polipeptídica para o fim de ligação da porção de ligação a um suporte cromatográfico ou outro substrato, e substituições de pares de resíduos de cisteína que formam normalmente ligações dissulfureto, por exemplo com resíduos de aminoácidos de ocorrência não natural possuindo cadeias laterais reactivas, com o fim de formação de uma ligação mais estável entre essas posições de aminoácidos que a ligação dissulfureto anterior. Todas estas moléculas de ligação modificadas são também considerados moléculas de ligação de acordo com a presente invenção, desde que conservem a capacidade de se ligar ao factor VIII e/ou a polipéptidos semelhantes a factor VIII.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A presente invenção torna possível a detecção ou purificação altamente selectiva de factor VIII e/ou polipéptidos semelhantes a factor VIII em, ou a partir de, soluções que os contenham.

O factor VIII e péptidos semelhantes a factor VIII podem ser produzidos de qualquer modo conhecido, incluindo síntese química; produção em células hospedeiras transformadas; secreção para meio de cultura por células de ocorrência natural ou bactérias, leveduras, fungos, células de insecto e células de mamífero transformadas de forma

recombinante; secreção a partir de organismos geneticamente manipulados (p. ex., mamíferos transgénicos); ou em fluidos biológicos ou tecidos, tais como sangue, plasma, etc. A solução que contém o factor VIII bruto tal como é inicialmente produzido (i. e., a solução de produção) será por vezes referida como a "corrente de alimentação".

Cada método de produção do factor VIII (ou um polipéptido semelhante a factor VIII) produz factor VIII numa corrente de alimentação que contém adicionalmente várias impurezas (em relação ao factor VIII). Um objectivo da presente invenção consiste em produzir ligandos de afinidade e preparações (tais como meios de cromatografia) compreendendo tais ligandos que permitam a purificação rápida e altamente específica do factor VIII a partir de uma determinada corrente de alimentação. Os ligandos de afinidade do factor VIII aqui obtidos podem ser adaptados para o isolamento do factor VIII a partir de uma determinada corrente de alimentação, sob condições pré-seleccionadas específicas. Se for utilizado um método de produção alternativo para o factor VIII, produzindo uma corrente de alimentação diferente, pode ser necessário um conjunto diferente de ligandos de afinidade para atingir o mesmo nível de purificação. O novo conjunto de ligandos poderá ser facilmente obtido seguindo os procedimentos aqui descritos.

As moléculas de ligação ao factor VIII da invenção ligam-se com elevada afinidade, comparável ou superior à de outras proteína tais como anticorpos que se sabe ligarem-se ao factor VIII. Além disso, os ligandos de afinidade preferidos aqui descritos libertam o factor VIII intacto e na forma activa sob condições de libertação específicas.

Seleccção das Condições de Ligação e de Libertação

As moléculas de ligação polipeptídicas de acordo com a presente invenção foram isoladas utilizando tecnologia de apresentação fágica, de modo a identificar péptidos de ligação ao factor VIII exibindo propriedades particulares pré-seleccionadas de ligação e de libertação. De acordo com esta metodologia, duas condições de solução podem ser pré-seleccionadas, i.e., condições de ligação e condições de libertação. As condições de ligação são um conjunto de condições de solução sob as quais se deseja que um polipéptido de ligação descoberto se ligue ao factor VIII alvo (ou polipéptido semelhante ao factor VIII); as condições de libertação são um conjunto de condições de solução sob as quais se deseja que um polipéptido de ligação descoberto não se ligue ao factor VIII (i.e., se dissocie do factor VIII). As duas condições podem ser seleccionadas para satisfazer qualquer critério do praticante, tal com facilidade de obtenção das condições, compatibilidade com outros passos de purificação, custo reduzido da alternância entre condições em comparação com outros meios de afinidade, etc. De preferência, as duas condições de solução são seleccionadas de forma a não afectar adversamente a estabilidade ou a actividade da proteína alvo (factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII) e de modo a diferir significativamente em relação a pelo menos um parâmetro da solução. Por exemplo, na condução da pesquisa por péptidos de ligação adequados aqui descrita, foram seleccionados ligadores que se dissociaram do alvo na presença de um tampão contendo etilenoglicol, ou condições de pH baixo (i. e., pH 2), ou combinações destas condições, que diferiram das condições

empregues para a ligação. Outro parâmetro que pode ser vantajosamente variado é a concentração de um sal, por exemplo NaCl, nos tampões de ligação e de eluição.

Seleccção de um Domínio de Ligação Parental

Em conjunto com a selecção de condições específicas de solução para a ligação e libertação desejadas do factor VIII, é seleccionado um domínio de ligação parental para servir como molde estrutural para as moléculas de ligação modificadas que exibirão as capacidades de ligação e libertação desejadas. O domínio de ligação pode ser uma proteína de ocorrência natural ou sintética ou uma região ou domínio de uma proteína. O domínio de ligação parental pode ser seleccionado com base no conhecimento de uma interacção conhecida entre o domínio de ligação parental e o factor VIII, mas isto não é crítico. De facto, não é essencial que o domínio de ligação parental tenha qualquer afinidade para o factor VIII: O seu objectivo é proporcionar uma estrutura a partir da qual possa ser gerada uma multiplicidade de análogos (uma "biblioteca"), multiplicidade de análogos essa que incluirá um ou mais análogos que exibem as propriedades de ligação e de libertação desejadas (e quaisquer outras propriedades seleccionadas). As condições de ligação e as condições de libertação discutidas *supra* podem ser seleccionadas com conhecimento do polipéptido exacto que servirá como domínio de ligação parental, ou com conhecimento de uma classe de proteínas ou domínios à qual o domínio de ligação parental pertence, ou totalmente independente da escolha do domínio de ligação parental. Semelhantemente, as condições de ligação e/ou de libertação podem ser seleccionadas tendo em conta interacções conhecidas entre um domínio de ligação e

o factor VIII, p. ex., para favorecer a interacção sob uma ou ambas as condições de solução, ou podem ser seleccionadas independentemente de tais interacções conhecidas. Da mesma forma, o domínio de ligação parental pode ser seleccionado tendo em conta as condições de ligação e/ou de libertação ou não, embora deva ser reconhecido que se os análogos do domínio de ligação forem instáveis sob as condições de ligação ou de libertação, não podem ser obtidas moléculas de ligação úteis.

A natureza do domínio de ligação parental influencia grandemente as propriedades dos péptidos derivados (análogos) que serão testados contra a molécula de factor VIII. Ao seleccionar o domínio de ligação parental, a consideração mais importante é a forma como os domínios análogos serão apresentados ao factor VIII, i.e., em que conformação o factor VIII e os análogos entrarão em contacto. Em formas de realização preferidas, por exemplo, os análogos serão gerados através de inserção de ADN sintético codificando o análogo num pacote genético replicável, resultando em apresentação do domínio à superfície de um microorganismo, tal como o fago M13, utilizando técnicas tais como as descritas, p. ex., em Kay *et al.*, "Phage Display of Peptide and Proteins: A Laboratory Manual", (Academic Press, Inc.; San Diego 1996) e Pat. U.S. No. 5,223,409 (Ladner *et al.*).

Para a formação de bibliotecas de apresentação fágica, é preferido utilizar polipéptidos estruturados como molde do domínio de ligação, em oposição a péptidos lineares não estruturados. A mutação dos resíduos da superfície numa proteína terá usualmente pouco efeito na estrutura global ou nas propriedades gerais (tais como tamanho, estabilidade

e temperatura de desnaturação) da proteína; embora ao mesmo tempo a mutação de resíduos da superfície possa afectar profundamente as propriedades de ligação da proteína. Quanto mais firmemente um segmento peptídico for constrangido, menos provável é que se ligue a qualquer alvo particular. Se ele se ligar, no entanto, a ligação é susceptível de ser mais forte e mais específica. Assim, é preferido seleccionar um domínio de ligação parental e, por sua vez, uma estrutura dos análogos polipeptídicos, que esteja constrangida dentro de uma estrutura possuindo algum grau de rigidez.

De preferência, o domínio proteico que é utilizado como molde ou domínio parental para gerar a biblioteca de análogos do domínio será uma pequena proteína ou polipéptido. Proteínas ou polipéptidos pequenos oferecem várias vantagens sobre as proteínas grandes: Primeiro, a massa por local de ligação é reduzida. Domínios proteicos altamente estáveis possuindo baixos pesos moleculares, p. ex., domínios de Kunitz (≈ 7 kDa), domínio de Kazal (≈ 7 kDa), domínios do inibidor de tripsina de *Cucurbita maxima* (CMTI) ($\approx 3,5$ kDa) e endotelina (≈ 2 kDa), podem exibir muito maior ligação por grama do que os anticorpos (150 kDa) ou os anticorpos de cadeia simples (30 kDa). Segundo, a possibilidade de ligação não específica é reduzida porque há menos superfície disponível. Terceiro, as proteínas ou polipéptidos pequenos podem ser modificados para terem locais de amarração únicos, de uma maneira que é impraticável para proteínas ou anticorpos maiores. Por exemplo, proteínas pequenas podem ser modificadas para terem lisinas apenas em locais adequados para amarração (p. ex., a uma matriz de cromatografia), mas isto não é possível para os anticorpos. Quarto, uma estrutura

polipeptídica constrangida é mais susceptível de reter a sua funcionalidade quando transferida com o domínio estrutural intacto de uma estrutura para outra. Por exemplo, a estrutura do domínio de ligação é susceptível de ser transferível da estrutura utilizada para apresentação numa biblioteca (p. ex., apresentada num fago) para uma proteína isolada removida da estrutura de apresentação ou imobilizada num substrato cromatográfico.

A imobilização dos polipéptidos de acordo com a invenção está contemplada, p. ex., em matrizes cromatográficas para formar meios de separação de factor VIII eficientes para soluções tais como sangue completo ou meio de cultura condicionado contendo factor VIII segregado a partir de uma célula hospedeira transformante. Através da selecção dos moldes de domínio de ligação adequados, polipéptidos de ligação possuindo uma única cisteína livre (não emparelhada com outra cisteína que forme vulgarmente uma ligação dissulfureto) podem ser isolados. Tais polipéptidos tiol-funcionais podem ser utilizados para imobilização altamente estável em substratos através da formação de um tioéter com iodoacetamida, ácido iodoacético ou grupos de ácidos carboxílicos semelhantes a iodo- α .

Semelhantemente, o grupo carboxilo C-terminal do domínio polipeptídico pode ser convertido numa hidrazida ($-\text{NH}-\text{NH}_2$), para reacção com um substrato aldeído-funcional ou outro substrato reactivo com amina. Esta técnica é preferida.

Existem muitos domínios proteicos pequenos, estáveis adequados para utilização como domínios de ligação parentais e para os quais a seguinte informação útil está disponível: (1) sequência de aminoácidos, (2) sequências de

vários domínios homólogos, (3) estrutura tridimensional, e/ou (4) dados de estabilidade ao longo de um intervalo de pH, temperatura, salinidade, solvente orgânico, concentração de oxidante. Alguns exemplos são: domínios de Kunitz (58 aminoácidos, 3 ligações dissulfureto), domínios de inibidor de tripsina de *Cucurbita maxima* (31 aminoácidos, 3 ligações dissulfureto), domínios relacionados com guanilina (14 aminoácidos, 2 ligações dissulfureto), domínios relacionados com enterotoxina termo-estável IA de bactérias gram-negativas (18 aminoácidos, 3 ligações dissulfureto), domínios EGF (50 aminoácidos, 3 ligações dissulfureto), domínios de kringle (60 aminoácidos, 3 ligações dissulfureto), domínios de ligação a hidratos de carbono fúngicos (35 aminoácidos, 2 ligações dissulfureto), domínios de endotelina (18 aminoácidos, 2 ligações dissulfureto), e domínio de ligação a IgG de *Streptococcus G* (35 aminoácidos, sem ligações dissulfureto). A maioria, mas não todos estes contêm ligações dissulfureto que mantêm e estabilizam a estrutura. O domínio de ligação parental pode também ser baseado numa única volta (um dissulfureto) de uma microproteína que seja homóloga a um domínio proteico conhecido ou não. Por exemplo, foram usadas voltas constrangidas de 7 a 9 aminoácidos para formar bibliotecas para isolamento de moléculas de ligação a factor VIII e polipéptidos semelhantes a factor VIII, tal como descrito abaixo. As bibliotecas baseadas nestes domínios, de preferência apresentadas em fagos, podem ser facilmente construídas e utilizadas para selecção de moléculas de ligação de acordo com esta invenção.

Proporcionar uma Biblioteca de Análogos do Domínio de Ligação Parental

Uma vez seleccionado um domínio de ligação parental, é criada uma biblioteca de potenciais moléculas de ligação para pesquisa contra um alvo, neste caso o factor VIII e/ou proteínas semelhantes a factor VIII, sob as condições de ligação desejadas e (opcionalmente) as condições de eluição (libertação) desejadas. A biblioteca é criada fazendo uma série de análogos, cada análogo correspondendo ao domínio de ligação parental excepto que possui uma ou mais substituições de aminoácidos na sequência de aminoácidos do domínio. Espera-se que as substituições de aminoácidos alterem as propriedades de ligação do domínio sem alterar significativamente a sua estrutura, pelo menos para a maioria das substituições. É preferido que as posições de aminoácidos que são seleccionadas para variação (posições de aminoácidos variáveis) sejam posições de aminoácidos de superfície, isto é, posições na sequência de aminoácidos dos domínios que, quando o domínio está na sua conformação mais estável, aparecem na superfície externa do domínio (i.e., a superfície exposta à solução). De preferência, as posições de aminoácidos a variar serão adjacentes ou próximas entre si, de modo a maximizar o efeito das substituições. Além disso, podem ser adicionados aminoácidos adicionais à estrutura do domínio de ligação parental. Em formas de realização preferidas, especialmente quando está disponível uma grande quantidade de informação sobre as interacções do factor VIII com outras moléculas, particularmente o domínio de ligação parental, as posições de aminoácidos que são essenciais para as interacções de ligação serão determinadas e conservadas no processo de construção da biblioteca de análogos (i. e., os aminoácidos essenciais para a ligação não serão variados).

O objectivo da criação da biblioteca de análogos consiste em proporcionar um grande número de potenciais moléculas de ligação para reacção com a molécula de factor VIII, e em geral quanto maior for o número de análogos na biblioteca, maior a probabilidade de que pelo menos um membro da biblioteca se ligue ao factor VIII e liberte sob condições pré-seleccionadas ou desejáveis para libertação. As bibliotecas concebidas seguindo uma estrutura de molde particular e limitando a variação de aminoácidos a posições particulares são muito preferidas, uma vez que uma única biblioteca pode englobar todos os análogos concebidos e as sequências incluídas serão conhecidas e apresentadas num número aproximadamente igual. Por outro lado, a substituição aleatória em apenas seis posições numa sequência de aminoácidos proporciona mais de 60 milhões de análogos, que é um tamanho de biblioteca que começa a apresentar limitações práticas, mesmo quando se utilizam técnicas de pesquisa tão potentes como a apresentação fágica. Bibliotecas maiores que isso colocariam problemas no manuseio, p. ex., os vasos de fermentação precisariam de ser de tamanho extraordinário, e mais importante, a probabilidade de ter todas as variações da sequência polipeptídica planeadas representadas na biblioteca preparada diminuiria drasticamente. É por isso preferido criar uma biblioteca desenhada ou tendenciosa em que as posições de aminoácidos designadas para variação são consideradas de forma a maximizar o efeito da substituição sobre as características de ligação do análogo, e os resíduos de aminoácidos permitidos ou planeados para utilização nas substituições são limitados, p. ex., com base em que eles são susceptíveis de fazer com que o análogo se ligue sob as condições de solução a que a biblioteca será pesquisada quanto a ligadores.

Tal como indicado anteriormente, as técnicas discutidas em Kay *et al. supra*, e Ladner *et al.*, U.S. 5,223,409 são particularmente úteis na preparação de uma biblioteca de análogos correspondendo a um domínio de ligação parental seleccionado, análogos esses que serão apresentados numa forma adequada para pesquisa em larga escala de um grande número de análogos relativamente a uma molécula de factor VIII alvo. A utilização de pacotes genéticos replicáveis, e de preferência bacteriófagos, é um método potente de gerar novas entidades de ligação polipeptídicas que envolve a introdução de um segmento de ADN exógeno, novo no genoma de um bacteriófago (ou outro pacote genético amplificável) de modo a que o polipéptido codificado pelo ADN não nativo surja à superfície do fago. Quando o ADN inserido contém diversidade de sequência, então cada fago receptor apresenta uma sequência de aminoácidos variante molde (parental) codificada pelo ADN, e a população de fagos (biblioteca) apresenta um vasto número de sequências de aminoácidos diferentes mas relacionadas.

Num procedimento de pesquisa para obter ligadores do factor VIII de acordo com esta invenção, uma biblioteca fágica é colocada em contacto com, e deixada ligar-se a, uma molécula de factor VIII alvo, usualmente imobilizada num suporte sólido. Os não ligadores são separados dos ligadores. De várias formas, os fagos ligados são libertados do factor VIII, colhidos e amplificados. Uma vez que o fago pode ser amplificado através da infecção de células bacterianas, mesmo alguns fagos de ligação são suficientes para revelar a sequência génica que codifica uma entidade de ligação. Utilizando estas técnicas, é possível recuperar um fago de ligação que esteja a cerca de

1 em 20 milhões na população. Uma ou mais bibliotecas, apresentando 10-20 milhões ou mais potenciais polipéptidos de ligação cada uma, podem ser rapidamente pesquisadas para encontrar ligadores do factor VIII de alta afinidade. Quando o processo de selecção funciona, a diversidade da população cai a cada ciclo até que apenas permaneçam os bons ligadores, i.e., o processo converge. Tipicamente, uma biblioteca de apresentação fágica conterá vários ligadores intimamente relacionados (10 a 50 ligadores em 10 milhões). Indicações de convergência incluem o aumento da ligação (medido através dos títulos dos fagos) e a recuperação de sequências intimamente relacionadas. Após ser identificado um primeiro conjunto de péptidos de ligação, a informação sobre a sequência pode ser utilizada para conceber outras bibliotecas tendenciosas para membros possuindo propriedades adicionais desejadas, p. ex., discriminação entre o factor VIII e fragmentos particulares ou impurezas intimamente relacionadas numa determinada corrente de alimentação.

Tais técnicas permitem não só pesquisar um grande número de potenciais moléculas de ligação como torná-lo prático para repetir os ciclos de ligação/eluição e construir bibliotecas tendenciosas secundárias para pesquisa de pacotes de apresentação de análogos que verifiquem os critérios iniciais. Utilizando estas técnicas, uma biblioteca tendenciosa de análogos pode ser pesquisada para revelar membros que se ligam firmemente (i.e., com afinidade elevada) sob as condições de pesquisa.

Síntese de Análogos Polipeptídicos

Seguindo os procedimentos acima delineados, moléculas de ligação adicionais para o factor VIII e/ou polipéptidos semelhantes a factor VIII podem ser isoladas a partir de bibliotecas de apresentação fágica aqui descritas ou outras bibliotecas de apresentação fágica ou colecções de potenciais moléculas de ligação (p. ex., bibliotecas combinatórias de compostos orgânicos, bibliotecas aleatórias de péptidos, etc.). Uma vez isolada, pode ser analisada a sequência de qualquer péptido de ligação individual ou a estrutura de qualquer molécula de ligação, e o ligador pode ser produzido em qualquer quantidade desejada utilizando métodos conhecidos. Por exemplo, as moléculas de ligação a polipéptidos aqui descritas, uma vez que as suas sequências são agora conhecidas, podem ser vantajosamente produzidas através de síntese química, seguida de tratamento em condições oxidantes apropriadas para se obter a conformação nativa, i.e., as ligações dissulfureto correctas. A síntese pode ser realizada através de metodologias bem conhecidas dos peritos na técnica (ver, Kelley et al. em "Genetic Engineering Principles and Methods", (Setlow, J.K., ed.), Plenum Press, NY., (1990) vol. 12, págs. 1-19; Stewart et al., "Solid-Phase Peptide Synthesis" (1989), W. H. Freeman Co., San Francisco). As moléculas de ligação da presente invenção podem ser produzidas através de síntese química ou através de semi-síntese. Os métodos de síntese química ou semi-síntese permitem a possibilidade de serem incorporados resíduos de aminoácidos não naturais.

As moléculas de ligação a polipéptidos da presente invenção são preparadas utilizando de preferência síntese peptídica em fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 (1963); Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5132

(1985)). A síntese em fase sólida começa no terminal carboxilo do putativo polipéptido através da ligação de um aminoácido protegido a uma resina adequada, que reage com o grupo carboxilo do aminoácido C-terminal para formar uma ligação que é facilmente clivada posteriormente, tal como uma resina de halometilo, p. ex., resina de clorometilo e resina de bromometilo, resina de hidroximetilo, resina de aminometilo, resina de benzidrilamina, ou resina de t-alquiloxicarbonil-hidrazida. Após a remoção do grupo de protecção α -amino com, por exemplo, ácido trifluoroacético (TFA) em cloreto de metileno e neutralização em, por exemplo, TEA, o ciclo seguinte na síntese está pronto para prosseguir. O α -amino restante e, se necessário, aminoácidos com cadeia lateral protegida são então acoplados sequencialmente na ordem desejada através de condensação para se obter um composto intermediário ligado à resina. Alternativamente, alguns aminoácidos podem ser acoplados uns aos outros formando um oligopéptido antes da adição do oligopéptido à cadeia polipeptídica crescente em fase sólida.

A condensação entre dois aminoácidos, ou um aminoácido e um péptido, ou um péptido e um péptido pode ser realizada de acordo com os métodos de condensação usuais tais como o método de azida, o método de anidrido ácido misto, o método DCC (diciclo-hexilcarbodiimida), o método de éster activo (método do éster p-nitrofenílico, método BOP [hexafluorofosfato de benzatxiazole-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfónio], método do éster imido do ácido N-hidroxisuccínico), e método do reagente K de Woodward.

Comum à síntese química de péptidos é a protecção dos grupos da cadeia lateral reactivos das várias porções de

aminoácidos com grupos protectores adequados nesse local até o grupo ser finalmente removido após a cadeia ter sido completamente montada. Também é comum a protecção do grupo α -amino num aminoácido ou fragmento enquanto essa entidade reage no grupo carboxilo seguido da remoção selectiva do grupo protector α -amino para permitir que a reacção subsequente ocorra nessa localização. Por consequência, é comum que, como um passo na síntese, seja produzido um composto intermediário que inclua cada um dos resíduos de aminoácidos localizados na sequência desejada na cadeia polipeptídica com vários destes resíduos possuindo grupos protectores das cadeias laterais. Estes grupos protectores são então vulgarmente removidos substancialmente ao mesmo tempo, de modo a produzir o produto resultante desejado após purificação.

Os grupos protectores típicos para protecção dos grupos α e ϵ -amino da cadeia lateral são exemplificados por benziloxicarbonilo (Z), isonicotiniloxicarbonilo (iNOC), O-clorobenziloxicarbonilo [Z(NO₂)], p-metoxibenziloxicarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amioxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, adamatiloxicarbonilo, 2(4-bifenil)-2-propiloxicarbonilo (Bpoc), 9-fluotetilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfoniletoxicarbonilo (Msc), trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo (NPS), difenilfosfinotioilo (Ppt), dimetilofosfinotioilo (Mpt), e semelhantes.

Como grupos protectores para o grupo carboxilo podem ser exemplificados, por exemplo, éster benzílico (OBzl), éster ciclo-hexílico (Chx), éster 4-nitrobenzílico (ONb), éster t-butílico (Obut), éster 4-piridilmetílico (OPic), e

semelhantes. É desejável que aminoácidos específicos tais como arginina, cisteína, e serina possuindo um grupo funcional diferente de grupos amino e carboxilo sejam protegidos por um grupo de protecção adequado, conforme a necessidade. Por exemplo, o grupo guanidino na arginina pode ser protegido com nitro, p-toluenossulfonilo, benziloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p-metoxibenzenossulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbenzenossulfonilo (Mds), 1,3,5-trimetilfenilsulfonilo (Mts), e semelhantes. O grupo tiol na cisteína pode ser protegido com p-metoxibenzilo, trifenilmetilo, acetilaminometil-etilcarbamoílo, 4-metilbenzilo, 2,4,6-trimetil-benzilo (Tmb), etc., e o grupo hidroxilo na serina pode ser protegido com benzilo, t-butilo, acetilo, tetra-hidropiraniolo, etc.

Após a sequência de aminoácidos desejada estar completa, o polipéptido intermediário é removido do suporte de resina através de tratamento com um reagente, tal como HF líquido e um ou mais sequestrantes contendo tio, que não só clivam o polipéptido da resina, como também clivam todos os grupos protectores da cadeia lateral restantes. Após a clivagem de HF, a sequência proteica é lavada com éter, transferida para um grande volume de ácido acético diluído, e agitada a pH ajustado a cerca de 8,0 com hidróxido de amónio. Após o ajuste do pH, o polipéptido toma o seu arranjo conformacional desejado.

Os polipéptidos de acordo com a invenção também podem ser preparados comercialmente por empresas proporcionando síntese de polipéptidos como um serviço (p. ex., BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA).

Utilização das Moléculas de Ligação em Detecção ou Purificação

Para detecção de factor VIII e/ou polipéptidos semelhantes a factor VIII numa solução tal como sangue ou meio condicionado suspeito de o conter, uma molécula de ligação de acordo com a invenção pode ser marcada de forma detectável, p. ex., marcada radioactivamente ou marcada enzimaticamente, em seguida colocada em contacto com a solução, e depois disso a formação de um complexo entre a molécula de ligação e o factor VIII alvo pode ser detectada. Uma molécula de ligação do fago de acordo com a invenção, i.e., um fago recombinante exibindo um polipéptido ligador do factor VIII à sua superfície, pode formar um complexo com o factor VIII e/ou polipéptidos semelhantes a factor VIII que é detectável como um sedimento num tubo de reacção, que pode ser detectado visualmente após assentamento ou centrifugação.

Alternativamente, pode ser usado um ensaio tipo sanduíche, em que uma molécula de ligação ao factor VIII é imobilizada num suporte sólido tal como um tubo de plástico ou poço, ou uma matriz cromatográfica tal como contas de Sepharose, em seguida a solução que se suspeita conter o factor VIII alvo é colocada em contacto com a molécula de ligação, imobilizada, os materiais que não se ligam são lavados, e o factor VIII ou polipéptido semelhante a factor VIII complexado é detectado utilizando um reagente de detecção adequado, tal como um anticorpo monoclonal reconhecendo o factor VIII alvo, reagente esse que é detectável através de alguns meios convencionais conhecidos na técnica, incluindo ser marcado de forma detectável, p. ex., marcado

radioactivamente ou marcado enzimaticamente, tal como com peroxidase de rábano, e semelhantes.

As moléculas de ligação de acordo com esta invenção serão extremamente úteis para isolamento de factor VIII e/ou polipéptidos semelhantes a factor VIII através de métodos de cromatografia de afinidade. Qualquer método convencional de cromatografia poderá ser empregue. De preferência, um ligando de afinidade da invenção será imobilizado num suporte sólido apropriado, p. ex., para empacotamento de uma coluna de cromatografia. O ligando de afinidade imobilizado pode então ser carregado ou colocado em contacto com uma corrente de alimentação sob condições favoráveis à formação de complexos molécula de ligação/factor VIII (ou polipéptido semelhante a factor VIII). Os materiais que não se ligam podem ser lavados, depois o factor VIII (ou polipéptido semelhante a factor VIII) pode ser eluído através da introdução de condições de solução que favorecem a dissociação do complexo de ligação.

Alternativamente, pode ser realizada cromatografia de lotes através de mistura de uma solução contendo o factor VIII alvo e a molécula de ligação, em seguida isolando os complexos do factor VIII alvo e as moléculas de ligação. Para este tipo de separação, são conhecidos muitos métodos. Por exemplo, a molécula de ligação pode ser imobilizada num suporte sólido, depois separada da corrente de alimentação juntamente com o factor VIII alvo através de filtração. Ou a molécula de ligação pode ser modificada com a sua própria etiqueta de afinidade, tal como uma cauda poli-His, que pode ser utilizada para ligar o ligador após os complexos se terem formado utilizando uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado. Uma vez separado, o factor VIII alvo

pode ser libertado da molécula de ligação sob condições de eluição e recuperado na forma pura.

Deve notar-se que, embora as exactas condições de ligação na obtenção dos polipéptidos que se ligam ao factor VIII aqui divulgados fossem pré-seleccionadas, o uso subsequente em purificação de afinidade pode revelar mais condições de ligação e libertação óptimas sob as quais o mesmo ligando de afinidade isolado operará. Assim, não é crítico que a molécula de ligação, após isolamento de acordo com esta invenção, seja sempre empregue apenas nas condições de ligação e de libertação que conduziram à sua separação da biblioteca.

O isolamento de moléculas de ligação do factor VIII de acordo com a presente invenção será ainda ilustrado abaixo. Os parâmetros específicos incluídos nos exemplos seguintes destinam-se a ilustrar a prática da invenção, e não são apresentados para de modo algum limitar o âmbito da invenção. Exemplos fora do âmbito das reivindicações são proporcionados como exemplos de referência.

Exemplo 1: O Isolamento de Moléculas de Ligação para um Polipéptido Semelhante a Factor VIII

As técnicas descritas acima foram empregues para isolar moléculas de ligação de elevada afinidade para ligandos para polipéptido semelhante a factor VIII produzido de forma recombinante consistindo em dois segmentos de factor VIII humano, i.e., aminoácidos 1-743 e de 1638 a 2332 do factor VIII humano, tal como descrito na Pat. U.S. No. 5,661,008 (Almstedt et al.), obtido com a designação comercial de REFACTO® de Genetics Institute, Inc.

(Cambridge, MA). O REFACTO® alvo foi proporcionado a uma concentração de cerca de 530 µg/mL (7800 IU/mL) em His 19,4 mM, NaCl 300 mM, CaCl₂ 3,4 mM e Tween 80 a 0,1%, pH 7,0.

Três bibliotecas, designadas TN7 (diversidade da sequência de aminoácidos de 5×10^9), TN8 (diversidade da sequência de aminoácidos de 6×10^9), e TN9 (diversidade da sequência de aminoácidos de 5×10^9), foram construídas para expressão de polipéptidos diversificados no fago M13. Cada biblioteca foi pesquisada quanto a ligadores para REFACTO® purificado. Cada uma das bibliotecas foi construída para apresentar uma microproteína baseada num molde de 11 ou 12 aminoácidos. A biblioteca TN7 utilizou uma sequência molde de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 33); a biblioteca TN8 utilizou uma sequência molde de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 34); a biblioteca TN9 utilizou uma sequência molde de Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa (SEQ ID NO: 35).

Três ciclos de pesquisas foram realizados para cada biblioteca. No final do terceiro ciclo da pesquisa os fagos eluídos foram propagados, e os isolados individuais de cada biblioteca (96 por condição de eluição) foram seleccionados aleatoriamente e testados através de técnicas padrão de ELISA quanto à ligação ao factor VIII alvo. Os fagos ligados foram detectados com anticorpo policlonal anti-M13 conjugado com HRP (Pharmacia). O substrato de Peroxidase TMB foi utilizado para HRP no mecanismo de detecção ELISA. O substrato TMB produz uma cor azul após digestão com peroxidase. A cor é quantificada através de absorvância a DO₆₃₀. Os fagos isolados que proporcionaram um sinal significativo (DO₆₃₀>0,25) acima do fundo foram considerados

clones positivos. A sequenciação de ADN destes isolados foi realizada para identificar o péptido apresentado.

As sequências de aminoácidos dos péptidos apresentados foram deduzidas a partir das sequências de ADN obtidas. Os dados de sequência dos isolados fágicos foram agrupados por biblioteca e separados de acordo com o grau de semelhança. A frequência a que qualquer dada sequência foi obtida foi anotada uma vez que esta indica selecção para um ligador específico. Verificou-se que isolados fágicos possuindo o mesmo péptido de apresentação estavam presentes em populações fágicas obtidas através de ambos os dois métodos de eluição.

Tabela 1: Sequências de aminoácidos de polipéptidos de ligação ao alvo da biblioteca TN7				
Isolado de TN7	Sequência	Frequência (eluição)	Sinal de ELISA	SEQ ID NO:
A06	His-Ser-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Phe-Ala	7/96 (EG)	0,5	4
A08	Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe	2/96 (EG)	0,4	5
D03	Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu	7/192 (EG/pH2)	0,2	6
D04	Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala	6/192 (EG/pH2)	0,3	7
A09	Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His	2/192 (EG/pH2)	0,1	8
C5/G10	Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala	1/96 (EG)	0,5	9

Tabela 2: Sequências de aminoácidos de polipéptidos de ligação ao alvo da biblioteca TN8				
Isolado de TN8	Sequência	Frequência (eluição)	Sinal de	SEQ ID

			ELISA	NO:
C10	His-Pro-Cys-Cly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro- Cys-Leu-His	10/192 (EG/pH2)	1,0	10
B05	Arg-Gly-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro- Cys-Leu-Asp	2/192 (EG/pH2)	0,2	11
E04	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro- Cys-Ala-Ala	3/192 (EG/pH2)	0,3	12
F02	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Asn-Pro- Cys-Ala-His	5/192 (EG/pH2)	0,3	13
A02	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro- Cys-Phe-His	3/96 (EG)	0,7	14
H07	His-Ala-Cys-Gly-Ser-Th-Phe-Arg-Pro- Cys-His-Ala	3/192	0,4	15
E02	His-Leu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pre- Cys-Asp-Ala	6/192 (EG/pH2)	0,4	16
C12	His-Leu-Cys-Phe-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro- Cys-Asp-Ala	1/96 (EG)	0,4	17
A01	His-Gly-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro- Cys-His-Ala	4/192 (EG/pH2)	0,2	18
E01	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Asn-Pro- Cys-Pro-Arg	1/96 (pH2)	0,2	19
H08	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Leu-Arg-Pro- Cys-Tyr-Asn	1/96 (EG)	1,0	20
All/G 10	His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro- Cys-Leu-Ala	1/96 (EG)	0,3	21

Tabela 3: Sequências de aminoácidos de polipéptidos de ligação ao alvo da biblioteca TN9

Isolado de TN9	Sequência	Frequência (eluição)	Sinal de ELISA	SEQ ID NO:
B04	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His- Cys-His	6/192 (EG/pH2)	0,8	22
G02	Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala-His- Cys-Leu	2/96 (EG)	0,2	23
B01	Phe-Cys-His-Val-Phe-Ris-Phe-Ser-His- Cys-Asp	5/192 (EG/pH2)	0,2	24
A01	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-	12/192	1,2	25

	Cys-His	(EG/pH2)		
E03	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Asn-Phe-Ser-His- Cys-Ser	4/192 (EG/pH2)	1,1	26
C02	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His- Cys-Asp	5/96 (pH2)	0,4	27
E12	Pho-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His- Cys-Ser	6/96 (EG)	1,0	28
E09	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Gln-Cys- Ala	4/192 (EG/pH2)	1,1	29
D06	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-His-His- Cys-Phe	2/192 (EG/pH2)	0,3	30
C01	Phe-Cys-His-Val-Phe-Asn-Phe-Val-His- Cys-Ser	2/192 (EG/pH2)	0,5	31
H11	Phe-Cys-His-Val-Phe-Pro-Phe-Leu-His- Cys-Asp	2/192 (EG/pH2)	0,2	32

Exemplo II: Preparação de Ligandos de Afinidade para um Factor VIII Alvo

Com base nos dados apresentados acima, foram seleccionados e sintetizados nove péptidos para imobilização num material de matriz de afinidade. Os péptidos sintetizados estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4

Sequência de Aminoácidos dos Ligandos de Afinidade e suas Densidades no Suporte Sólido			
Ligando de Afinidade	Isolado Fágico	Sequência (volta dissulfureto sublinhada)	Densidade do Ligando mg/mL (μmol/mL)
CS-453	C10-TN8	AEGTGDHPCG <u>SWLRPCL</u> HDPGPEGGS-NHMH ₂	2,64 (0,98)
CS-454	E02-TN8	AEGTGDHLCG <u>AWFRPCD</u> ADPGPEGGS-NHNH ₂	1,79 (0,67)
CS-455	A09-TN7	AEGTGDFHCIGV <u>WFCL</u> HDPGPEGGS-NHNH ₂	2,21 (0,83)
CS-456	A08-TN7	AEGTGDFGCSWLF <u>PCPF</u> DGPEGGS-NHNH ₂	3,69 (1,43)
CS-458	B04-TN9	AEGTGDFCWVFAFDH <u>CH</u> DGPEGGS-NHNH ₂	3,15 (1,17)

CS-459	E09-TN9	AEGTGDFCWFVPEQHCA ^{DPG} PEG ^{GGG} S-NHNH ₂	2,72 (1,02)
CS-460	D06-TN9	AEGTGDFCWFVFPFHHCFD ^{PG} PEG ^{GGG} S-NHNH ₂	4,24 (1,54)
GI-1	C05/G10-TN7	Acetil-AEGTGDRLC ^{SWV} SPCSADPEG ^{GGG} SK	0,83 (0,32)
GI-2	A11/G10-TN8	Acetil- AEGTGDHRC ^{GSWL} HPCLADPEG ^{GGG} SK	0,43 (0,16)

Os péptidos de afinidade da Tabela 4 são identificados, pela ordem de cima, com SEQ ID NOs: 36-44.

Os nove péptidos de afinidade condutores foram produzidos através de métodos de síntese em fase sólida clássicos tal como descrito acima. Para facilitar a imobilização num suporte sólido, uma região ligadora curta de sete aminoácidos de hidrazida funcional (-PGPEG^{GGG}S-NHNH₂; SEQ ID NO: 45) foi incorporada no terminal carboxilo de sete dos péptidos (ver Tabela 4). Um ligador de imobilização alternativo foi utilizado com dois dos péptidos (GI-1 e GI-2 na Tabela 4), i.e., -PEG^{GGG}SK; (SEQ ID NO: 46), exibindo uma lisina C-terminal para imobilização e um terminal amino acetilado.

Os ligandos candidatos foram imobilizados numa resina cromatográfica de etilenoglicol-metacrilato substituído com formilo (Toyopearl Formyl 650-M, tamanho do poro de ≈ 1000 Å; TosoHaas, Montgomeryville, PA). Os péptidos contendo hidrazida foram imobilizados facilitando a formação da ligação de hidrazona, os péptidos GI-1 e -2 foram imobilizados através de aminaçãõ redutora utilizando NaCNBH₃. A quantidade de polipéptido imobilizada no suporte sólido foi determinada através da quantificação da quantidade de polipéptido livre restante na solução. A quantidade de ligando imobilizado por mL de resina estava

no intervalo de 0,7-1,5 μmol para os péptidos imobilizados com hidrazina.

Os nove péptidos foram avaliados através de cromatografia de afinidade quanto à sua capacidade para capturar o REFACTO® descrito no Exemplo I, sob condições de ligação e libertação específicas. Os tampões utilizados nestas avaliações estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5

Condições de Ligação e Eluição Empregues	
Tampão de Ligação	NH_4OAc 100 mM, pH 6,3, NaCl 0,8 M, Sorbitol 1 M, Tween 80 a 0,02%, EDTA 3 mM, CaCl_2 5 mM
Tampão de Eluição A	etilenoglicol a 50%, His 20 mM, NaCl 0,25 M, CaCl_2 20 mM, Tween 80 a 0,01%, pH
Tampão de Eluição B	CaCl_2 0,35 M, His 20 mM, NaCl 0,3 M, Tween 80 a 0,1%, pH 7
Limpeza a pH 2	Gly 100 nM, NaCl 1 M, pH 2

O polipéptido semelhante a factor VIII (REFACTO®) foi diluído em Tampão SP até uma concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$. As resinas de afinidade ($\approx 350 \mu\text{L}$) foram, cada uma, empacotadas em colunas de vidro e aproximadamente 150 μg do factor VIII alvo foram aplicados nas colunas de afinidade preparadas a um caudal de 200 $\mu\text{L/minuto}$ (velocidade linear de 170 cm/hora). O material ligado foi eluído sequencialmente com os tampões tal como mostrado na Tabela 5, e a eluição da proteína foi monitorizada através de absorvância de UV a 280 nm. As fracções foram colhidas e a massa e a actividade do polipéptido semelhante a factor VIII recuperado foi determinada através de HPLC de fase inversa e através de ensaio enzimático.

Para a determinação da massa, foi gerada uma curva padrão com REFACTO® (0-200 µg) e a quantidade presente em cada fracção foi calculada de acordo com técnicas bem conhecidas na arte. A HPLC de fase inversa na presença de EDTA 20 mM foi utilizada para romper a molécula de REFACTO® nas suas subunidades componentes, que foram eluídas com um gradiente de acetonitrilo/TFA a 0,01%. O ensaio de actividade foi um ensaio baseado em Factor IX e X. Os resultados para cada resina de afinidade estão expostos abaixo (Tabela 6).

Tabela 6

Sumário dos Dados Obtidos com Nove Ligandos de Afinidade						
Péptido	Ensaio	Condição de Eluição (% de recuperação)				
		Fluxo	A	B	pH2	Total
Resina Não Tratada	Actividade de RP-HPLC	64,4	2,8	0	0	67,2
		64,4	0,6			65,0
CS-453	Actividade de RP-HPLC	0	43,2	0	0	43,2
		0	26,4			26,4
CS-454	Actividade de RP-HPLC	2,5	45,1	0	0	47,6
		2,2	42,4			44,6
CS-455	Actividade de RP-HPLC	65,8	1,4	0	0	67,2
		61,6	1,3			62,9
CS-456	Actividade de RP-HPLC	3,4	44,8	0	0	48,2
		4,8	43,0			47,8
CS-458	Actividade de RP-HPLC	1,8	54,3	0	0	56,1
		1,4	55,6			57,0
CS-459	Actividade de RP-HPLC	1,5	42,1	0	0	43,7
		6,4	31,2			37,6
CS-460	Actividade de RP-HPLC	24,6	28,8	0	0	53,4
		28,4	0			28,4

GI-1	Actividade de RP-HPLC	65,7	0	0	0	65,7
		64,0	0			64,0
GI-2	Actividade de RP-HPLC	31,3	28,1	0	2,0	61,4
		33,7	20,3			53,9

Em geral, a quantidade total de factor VIII alvo recuperado após cromatografia ao longo dos nove ligandos estava no intervalo de 40-67%. Os ligandos polipeptídicos CS-453, CS-454, CS-456, e CS-459 capturaram virtualmente todo o factor VIII alvo aplicado, sendo o material ligado eluído na presença de etilenoglicol. Não se verificou actividade no eluente a pH 2, portanto assumiu-se que nenhum dos alvos permaneceu ligado ao ligando. A incapacidade das resinas de CS-455 e GI-1 para capturar o alvo pode ser devida à degradação ou instabilidade do péptido, ou a baixa densidade do ligando no suporte.

Exemplo III: Ligação Comparativa de nhfVIII e REFACTO®

Foram conduzidas experiências para demonstrar que os ligandos polipeptídicos imobilizados do Exemplo II se ligam e libertam factor VIII humano nativo (nhfVIII) sob condições semelhantes e com rendimentos semelhantes aos observados com o polipéptido semelhante a factor VIII REFACTO®.

Para estas experiências, foi obtido nhfVIII a partir de American Diagnostica, Inc. (Greenwich, CT; produto #408 nat) na forma de um pó liofilizado contendo agentes estabilizantes. O nhfVIII foi reconstituído de acordo com as instruções do fabricante num tampão de reconstituição (NH₄OAc 72 mM, pH 6,3, NaCl 360 mM, Tween 80 a 0,04% (Tampão 1)).

Um estojo comercial de ELISA (estojo de ELISA IMUBIND fVIII, Produto #884, American, Inc., Greenwich, CT) desenvolvido para detectar o factor VIII foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante para detectar ambos os alvos REFACTO® e nhfVIII. O estojo emprega um ensaio ELISA em sanduíche em que o alvo é capturado através de um anticorpo monoclonal imobilizado e o alvo capturado é detectado com um segundo conjugado anticorpo monoclonal-peroxidase de rábano (HRP). A adição do substrato de peroxidase e a sua subsequente reacção com a HRP produz uma cor azul (detectada a 630 nm) que muda para amarelo (detectada a 450 nm) com a adição da solução stop de ácido sulfúrico 0,5 N. A resposta de cor é calibrada com padrões de factor VIII proporcionados pelo fabricante.

A ligação de REFACTO® foi testada no Tampão 1. A ligação tanto de REFACTO® como de nhfVIII foi testada utilizando três resinas de afinidade preparadas tal como no Exemplo II, utilizando os péptidos de afinidade CS-454, CS-456, e CS-458 imobilizados em meio Toyopearl Formyl 650-M. A densidade do ligando para cada polipéptido foi de 1,79 mg/mL (0,67 μ mol/mL), 3,69 mg/mL (1,43 μ mol/mL) e 3,15 mg/mL (1,17 μ mol/mL), respectivamente.

Para cada um dos três péptidos imobilizados testados, as contas de péptido de 200 mL de uma pasta a 50% de suspensão de polipéptido ligado a Toyopearl foram centrifugados rapidamente (30 segundos a 2000 \times g à temperatura ambiente), o líquido sobrenadante foi removido, e as contas (sedimentos) foram lavadas duas vezes. Para cada lavagem, as contas foram ressuspensas em 500 μ L de Tampão 1 e centrifugadas como anteriormente.

A solução de reserva de REFACTO® foi diluída até uma concentração final de 200 U/mL em Tampão 1 e 250 µL da solução diluída (≈50 U no total) foram adicionados a um sedimento lavado de cada uma das contas de péptido. A suspensão foi incubada numa misturadora de inversão à TA durante uma hora, período de ligação após o qual as contas foram sedimentadas através de centrifugação (30 segundos, 2000 ×g) e as soluções sobrenadantes, representando a fracção não ligada ("Não ligado" na Tabela 7, abaixo), foram removidas e retidas para ensaio de actividade de factor VIII não ligado.

As contas sedimentadas foram lavadas uma vez através da adição de 250 µl de Tampão 1, misturadas brevemente e a suspensão centrifugada tal como anteriormente. As soluções de sobrenadante ("Lavagem" na Tabela 7) foram removidas e retidas para ensaio da actividade do factor VIII.

As contas lavadas foram ressuspensas em 250 µl de Tampão A (L-Histidina-HCl 20 mM, NaCl 250 mM, CaCl₂ 20 mM, Tween 80 a 0,01%, etilenoglicol a 50%, pH 6,3) e incubadas numa misturadora de inversão durante 15 minutos à temperatura ambiente. No final do período de eluição, as suspensões foram centrifugadas tal como acima. As soluções de sobrenadante ("Eluato" na Tabela 7) foram removidas e retidas para ensaio da actividade do factor VIII eluído.

A solução de REFACTO® de partida (diluída) (entrada) e cada amostra (Não ligado, Lavagem, e Eluato) tomadas tal como descrito acima foram diluídas 1:1400 em Diluente de Ensaio (fornecido com o estojo), depois submetidos a ELISA

utilizando o estojo de ensaio de factor VIII comercial. A Tabela 7 resume os resultados.

Tabela 7

Ligação e Eluição de Lotes de REFACTO® com Ligandos Polipeptídicos Imobilizados					
Ligando Peptídico Imobilizado	% de Entrada Recuperada em:				
	Entrada	Não ligado	Lavagem	Eluído	Total
CS-454	100	24	12	49	85
CS-456	100	47	20	24	91
CS-458	100	20	10	47	76

Para cada polipéptido imobilizado testado, quase todo o REFACTO® (>75%) adicionado à reacção de ligação foi recuperado nas fracções Não ligado, Lavagem, e Eluato. Uma pequena quantidade de material (10%-25%) pode ter sido retida nas contas após eluição.

Em seguida, as contas de afinidade foram regeneradas através de uma lavagem em etilenoglicol a 50%, His 20 mM, NaCl 0,25 M, CaCl₂ 20 mM, Tween 80 a 0,01%, pH 7, e duas lavagens com 250 µL de H₃PO₄ 30 mM, NaCl 1 M, pH 2 (15 minutos para cada lavagem). Após as lavagens a pH 2, as contas foram lavadas uma vez em PBS contendo azida a 0,05% e armazenadas a 4°C.

Uma amostra de nhfVIII foi diluída até uma concentração final de 100 U/mL através da adição de 2,32 mL de H₂O, 180 mL de NH₄OAc 1 M, pH 6,3 (a 72 mM), e 1 µL de Tween 80 (a 0,04%). A solução de reserva de REFACTO® foi diluído até 100 U/mL num Tampão 1 modificado, em que a concentração de NaCl foi reduzida de 660 mM para 330 mM.

Os péptidos imobilizados foram testados quanto à ligação a nhfVIII em comparação com REFACTO®. Como controlo de não ligação, um polipéptido da biblioteca TN9 (B10), que se liga a um alvo não relacionado e não se liga a um factor VIII alvo, foi imobilizado nas mesmas contas de metacrilato, tal como descrito acima. Em seguida, as soluções de nhfVIII e REFACTO® foram misturadas com contas de afinidade regeneradas possuindo os ligandos CS-454, CS-456 e CS-458 num procedimento de purificação de lotes comparativo. As condições reaccionais são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8

Condições Reaccionais para o Teste de Ligação de nhfVIII

Ligando Peptídico Imobilizado	Volume da Pasta de Contas (µL)	Alvo (100 U/mL)	Volume Reaccional (µL)
CS-454	200	hfvIII	500
CS-456	200	hfvIII	500
CS-458	200	hfvIII	500
TN9-B10	200	hfvIII	500
CS-458	100	REFACTO®	250
TN9-B10	100	REFACTO®	250

Os resultados destes ensaios são expostos na Tabela 9.

Tabela 9

Ligação e Eluição de Lotes de nhfVIII e REFACTO® com
Ligandos Polipeptídicos Imobilizados

Ligando	Alvo	% do Total Recuperado em:
----------------	-------------	----------------------------------

Peptídico Imobilizado		Não ligado	Lavagem	Eluído
CS-454	hfVIII	67	12	21
CS-456	hfVIII	70	14	16
CS-458	hfVIII	48	13	39
TN9-B10	hfVIII	86	14	0
CS-458	REFACTO®	59	14	27
TN9-B10	REFACTO®	90	10	0

Em conclusão, os ligandos polipeptídicos imobilizados, CS-458, CS-454, e CS-456 ligam-se e libertam nhfVIII sob condições semelhantes e com rendimentos semelhantes aos observados anteriormente com um polipéptido semelhante ao factor VIII.

Na sequência da descrição anterior, as características importantes para as moléculas de ligação de afinidade permitindo a detecção ou separação de factor VIII ou polipéptidos semelhantes a factor VIII em, ou a partir de, qualquer solução podem ser apreciadas. Formas de realização adicionais das moléculas de ligação da invenção e métodos alternativos adaptados a uma determinada solução ou corrente de alimentação, serão evidentes a partir do estudo da descrição anterior.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Dyax Corporation

<120> Moléculas de Ligação ao Factor VIII Humano e a Proteínas Semelhantes a Factor VIII

<130> 7293(4) EP

<140> EP 09155033.5

<141> 2006-05-02

<150> 09/224,785

<151> 1999-01-04

<160> 46

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(2)

<223> Xaa na posição 1 pode ser Arg, Phe, His ou Pro; não está implicada informação em relação à frequência relativa

de resíduos alternativos, Xaa na posição 2 pode ser Ser, Gly, Leu ou His; não está implicada informação em relação à frequência relativa de resíduos alternativos.

<400> 1

Arg Gly Cys Asn Gly Ile Phe Phe Cys Leu Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(2)

<223> xaa1 é Arg ou His; Xaa2 é Ala, Arg, Gly, Leu ou Pro

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa4 é Gly ou Phe; Xaa5 é Ala ou Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(8)

<223> Xaa7 é Leu ou Phe; Xaa8 é Arg, Asn ou His

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(12)

<223> Xaa11 é Ala, Asp, His, Leu, Phe, Pro ou Tyr; Xaa12 é Ala, Arg, Asn, Asp ou His

<400> 2

Arg Ala Cys Gly Ala Trp Leu Arg Pro Cys Ala Ala
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa3 é His ou Trp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(6)

<223> Xaa5 é His ou Phe; Xaa6 é Ala, Asn, His ou Pro

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa8 é Ala, Asn, Asp, Gln, His, Leu, Ser ou Val

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> xaa11 é Ala, Asp, His, Leu, Phe ou Ser

<400> 3

Phe Cys His Val His Ala Phe Ala His Cys Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 4

His Ser Cys Gly Ser Trp Leu Phe Pro Cys Phe Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequência

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 5

Phe Gly Cys Ser Trp Leu Phe Pro Cys Pro Phe
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 6

Pro	His	Cys	Asn	Trp	Leu	Phe	Pro	Cys	Ser	Leu
1				5					10	

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 7

Arg	Leu	Cys	Ser	Trp	Ile	Ser	Pro	Cys	Ser	Ala
1				5					10	

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 8

Phe His Cys Ile Gly Val Trp Phe Cys Leu His
1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 9

Arg Leu Cys Ser Trp Val Ser Pro Cys Ser Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 10

His Pro Cys Gly Ser Trp Leu Arg Pro Cys Leu His
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 11

Arg Gly Cys Gly Ser Trp Leu Arg Pro Cys Leu Asp
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 12

His Pro Cys Gly Ser Trp Leu His Pro Cys Ala Ala
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 13

His Pro Cys Gly Ser Trp Phe Asn Pro Cys Ala His
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 14

His Pro Cys Gly Ser Trp Phe Arg Pro Cys Phe His
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 15

His Ala Cys Gly Ser Trp Phe Arg Pro Cys His Ala
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 16

His Leu Cys Gly Ala Trp Phe Arg Pro Cys Asp Ala
 1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 17

His Leu Cys Phe Ala Trp Phe Arg Pro Cys Asp Ala
 1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 18

His Gly Cys Gly Ala Trp Phe Arg Pro Cys His Ala
 1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 19

His Pro Cys Gly Ala Trp Phe Asn Pro Cys Pro Arg
1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 20

His Pro Cys Gly Ala Trp Leu Arg Pro Cys Tyr Asn
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 21

His Arg Cys Gly Ser Trp Leu His Pro Cys Leu Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 22

Phe	Cys	Trp	Val	Phe	Ala	Phe	Asp	His	Cys	His
1				5					10	

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 23

Phe	Cys	Trp	Val	His	Pro	Phe	Ala	His	Cys	Leu
1				5					10	

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 24

Phe Cys His Val Phe His Phe Ser His Cys Asp
1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 25

Phe Cys Trp Val Phe Ala Phe Asp His Cys His
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 26

Phe Cys Trp Val Phe Asn Phe Ser His Cys Ser
1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 27

Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe Asn His Cys Asp
1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 28

Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe Asn His Cys Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 29

Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe Gln His Cys Ala
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 30

Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe His His Cys Phe
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 31

Phe Cys His Val Phe Asn Phe Val His Cys Ser
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido de volta de ligação sintético

<400> 32

Phe Cys His Val Phe Pro Phe Leu His Cys Asp
 1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: molde para o
 péptido de volta de ligação sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(11)

<223> as posições de aminoácidos 3 e 9 são Cys invariantes;
 todas as outras posições Xaa são variadas mas não Cys, para
 proporcionar uma biblioteca de 5×10(9) péptidos diferentes
 com base na sequência do molde

<400> 33

Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala
 1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: molde para o
 péptido de volta de ligação sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(12)

<223> as posições de aminoácidos 3 e 10 são Cys invariantes; todas as outras posições Xaa são variadas mas não Cys, para proporcionar uma biblioteca de $6 \times 10(9)$ péptidos diferentes com base na sequência molde

<400> 34

Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala
1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: molde para o péptido de volta de ligação sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(11)

<223> as posições de aminoácidos 2 e 10 são Cys invariantes; todas as outras posições Xaa são variadas mas não Cys, para proporcionar uma biblioteca de $5 \times 10(9)$ péptidos diferentes com base na sequência molde

<400> 35

Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala
1 5 10

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 36

Ala Glu Gly Thr Gly Asp His Pro Cys Gly Ser Trp Leu Arg Pro Cys
1 5 10 15

Leu His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 37

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VII sintético

<400> 37

Ala Glu Gly Thr Gly Asp His Leu Cys Gly Ala Trp Phe Arg Pro Cys
1 5 10 15

Asp Ala Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 38

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 38

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe His Cys Ile Gly Val Trp Phe Cys Leu
1 5 10 15

His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly ser
20 25

<210> 39

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 39

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Gly Cys Ser Trp Leu Phe Pro Cys Pro
1 5 10 15

Phe Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly ser
20 25

<210> 40

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 40

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Cys Trp Val Phe Ala Phe Asp His Cys
 1 5 10 15
 His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 41

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 41

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe Gln His Cys
 1 5 10 15
 Ala Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 42

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe His His Cys
 1 5 10 15

Phe Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 43

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Arg Leu Cys Ser Trp Val Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15

Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
 20 25

<210> 44

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligando de afinidade ao Factor VIII sintético

<400> 44

Ala Glu Gly Thr Gly Asp His Arg Cys Gly Ser Trp Leu His Pro Cys
 1 5 10 15

Leu Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
 20 25

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligador de imobilização sintético para o terminal C do péptido

<400> 45

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: ligador de imobilização sintético para o terminal C do péptido

<400> 46

Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
1 5

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido que se liga ao factor VIII ou a um fragmento deste mantendo a actividade pró-coagulante do factor VIII, em que o referido polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe (SEQ ID NO:5);

Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu (SEQ ID NO:6);

Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (SEQ ID NO:7);

Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His (SEQ ID NO:8); e

Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (SEQ ID NO:9).

2. Polipéptido tal como reivindicado na reivindicação 1 que se liga ao factor VIII ou a um fragmento deste que mantém as propriedades pró-coagulantes do factor VIII, em que o referido polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGSNHNH₂ (SEQ ID NO:38);

AEGTGDFGCSWLFPCPFDPGPEGGS-NHNH₂ (SEQ ID NO:39); e

Acetil-AEGTGDRLCVWSPCSADPEGGSK (SEQ ID NO:43).

3. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1 que é capaz de se ligar a factor VIII humano ou um fragmento deste que mantenha a actividade pró-coagulante do factor VIII quando numa solução compreendendo: NH₄OAc

100 mM, NaCl 0,8 M, sorbitol 1 M, monoaleato de polioxietileno Sorbitano a 0,02%; EDTA 3 mM, CaCl_2 5 mM, pH 6,3 e capaz de dissociação a partir do referido factor VIII humano ou fragmento destes quando numa solução contendo etilenoglicol a 50%.

4. Polipéptido de acordo com a reivindicação 3, que se dissocia do referido factor VIII ou fragmento deste quando em contacto com uma solução compreendendo etilenoglicol a 50%, His 20 mM, NaCl 0,25 M, CaCl_2 20 mM, monoaleato de polioxietileno Sorbitano a 0,01%, pH 7.
5. Método para detecção de factor VIII humano ou um fragmento deste mantendo as propriedades pró-coagulantes do factor VIII numa solução compreendendo:
 - (a) contacto da referida solução com um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, e
 - (b) determinação de se a ligação ocorreu entre o referido polipéptido e o referido factor VIII humano ou fragmento deste.
6. Método para purificação do factor VIII humano ou de um fragmento deste mantendo as propriedades pró-coagulantes do factor VIII compreendendo:
 - (a) imobilização de um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 num suporte sólido;
 - (b) contacto da solução contendo o referido factor VIII humano ou fragmento deste com o referido suporte;e, a partir daí,
 - (c) separação da solução a partir do referido suporte.

7. Método de acordo com a reivindicação 5 ou reivindicação 6, em que o referido polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe (SEQ ID NO:5);

Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu (SEQ ID NO:6);

Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (SEQ ID NO:7);

Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His (SEQ ID NO:8); e

Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (SEQ ID NO:9).

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o referido polipéptido consiste numa sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGS-NH₂ (SEQ ID NO:38);

AEGTGDFGCSWLFPCFPDGPPEGGS-NH₂ (SEQ ID NO:39); e

Acetil-AEGTGDRLCVWSPCSADPEGGSK (SEQ ID NO:43).

9. Meio de separação compreendendo:

(a) um material de matriz cromatográfica, e, imobilizado nele,

(b) um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe (SEQ ID NO:5);

Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu (SEQ ID NO:6);

Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (SEQ ID NO:7);

Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His (SEQ ID NO:8); e

Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (SEQ ID NO:9).

10. Meio de separação consistindo no produto de reacção de:

(a) um material de matriz cromatográfica amino-reactivo, e

(b) um polipéptido seleccionado a partir do grupo que consiste em:

AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGS-NH₂ (SEQ ID NO:38);

AEGTGDFGCSWLFPCFPDPGPEGGS-NH₂ (SEQ ID NO:39); e

Acetyl-AEGTGDRLCVWSPCSADPEGGSK (SEQ ID NO:43).

11. Meio de separação da reivindicação 10, em que o referido material de matriz é uma resina cromatográfica de metacrilato de aldeído funcional.

12. Meio de separação da reivindicação 11, em que a referida resina é um suporte do copolímero de etilenoglicol-metacrilato substituído com formilo.

13. Método para separação do factor VIII ou um fragmento deste a partir de uma solução compreendendo:

(a) contacto da referida solução com meio de separação tal como definido na reivindicação 9 sob condições de ligação,

(b) remoção do material não ligado, e

(c) eluição do factor VIII ligado ou fragmento deste a partir do referido meio de separação.

14. Método para purificação de um factor VIII humano ou fragmento deste mantendo as propriedades pró-coagulantes do factor VIII compreendendo:

(a) contacto de uma solução contendo o referido factor VIII humano ou fragmento deste com um suporte sólido possuindo um polipéptido de ligação imobilizado no suporte, em que o polipéptido de ligação é um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4;

(b) separação da solução do referido suporte, e

(c) obtenção do factor VIII humano e/ou polipéptido semelhante a factor VIII ligado do suporte.

Lisboa,

RESUMO

"MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO FACTOR VIII HUMANO E A PROTEÍNAS SEMELHANTES AO FACTOR VIII"

São divulgados métodos para detecção do factor VIII humano ou de polipéptidos semelhantes ao factor VIII em, e seu isolamento a partir de, soluções tais como sangue ou meio condicionado, juntamente com reagentes adequados para o fim compreendendo porções de ligação que reconhecem o factor VIII humano e/ou um polipéptido semelhante ao factor VIII e formam um complexo de ligação com este. São particularmente divulgadas porções de ligação a polipéptidos preferidas.