(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 984 653**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C12Q 1/56 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2019 PCT/IB2019/051227**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2019 WO19162813**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2019 E 19709125 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3555123**

(54) Título: **Composición que comprende proteína del receptor GPIba recombinante**

(30) Prioridad:

20.02.2018 US 201862632870 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2024

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

BOOTH, ELIZABETH;
MONTANINI, VIRGINIA;
HALL, JOHN A. y
BERRY, JODY

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende proteína del receptor GPIba recombinante

Antecedentes

La enfermedad de Von Willebrand (EVW) es un trastorno hemorrágico leve, hereditario y común conocido por plantear dificultades de diagnóstico significativas. Los pacientes con EVW puede que no sufran hemorragias durante su vida diaria, pero durante los períodos de dificultad hemostática (por ejemplo, trabajo dental, cirugía, parto o transfusión) se pueden producir problemas. Antes de los procedimientos con dificultades hemostáticas, los médicos solicitan de forma rutinaria un panel de hemostasia, lo que a menudo da lugar a pruebas adicionales específicas para EVW.

El factor de Von Willebrand (FVW) se une a muchas moléculas extracelulares y de la superficie celular diferentes y desempeña un papel importante en la hemostasia y la coagulación. En particular, el FVW es importante en la formación de un trombo hemostático y se une específicamente a varios complejos de proteínas de la superficie plaquetaria, incluyendo el complejo de glucoproteína Ibα-V-IX, que reticula plaquetas y otras moléculas extracelulares (por ejemplo, colágeno subendotelial). El complejo de glucoproteína Ibα-V-IX está compuesto por cuatro subunidades, GPIbα, GPIbβ, GPV y GPIX, y está presente en la membrana de las plaquetas. GPIbα y GPIbβ se enlazan por puentes disulfuro, mientras que GPV y GPIX se asocian no covalentemente con el complejo. La subunidad GPIbα porta el sitio de unión para FVW, α-trombina, integrina leucocitaria αMβ2 y P-selectina.

El diagnóstico de EVW es complicado por sus diversos tipos, lo que tradicionalmente requiere múltiples pruebas para proporcionar una comprensión clara del mecanismo de enfermedad subyacente. La EVW tipo 1 se provoca por una deficiencia cuantitativa de FVW. La EVW tipo 2 se provoca por una deficiencia de FVW cualitativa. La EVW tipo 2 se subdivide además en tipo 2A, provocada por mutaciones que disminuyen la proporción de multímeros de FVW funcionales, lo que disminuye la adhesión plaquetaria; tipo 2B, provocada por mutaciones en el FVW que incrementan la unión plaqueta-FVW; tipo 2M, provocada por mutaciones que disminuyen la adhesión plaquetaria dependiente de FVW; y tipo 2N, provocada por mutaciones que alteran la unión al factor VIII. La EVW tipo 3 se provoca por una insuficiencia prácticamente completa del FVW y una disminución en el factor VIII, que normalmente se estabiliza por el FVW circulante. La EVW adquirida es un trastorno hemorrágico adquirido relativamente raro que normalmente se produce en pacientes ancianos, en asociación con otra patología subyacente. Finalmente, la EVW de tipo plaquetario resulta de una potenciación en la unión de FVW a la glucoproteína Ibα (GPIbα), provocada por la mutación del gen que codifica GPIbα. Se han desarrollado diferentes ensayos para cuantificar la actividad FVW, tales como el ensayo del antígeno del FVW (FVW:Ag), que mide la concentración total de FVW en plasma, o el ensayo del cofactor de ristocetina (FVW:RCo) que mide la unión de FVW a GPIbα de plaquetas durante la aglutinación inducida por el antibiótico ristocetina. Sin embargo, el ensayo FVW:Ag solo proporciona información sobre el nivel cuantitativo de FVW presente en el plasma de un paciente sin preocuparse por la calidad del FVW presente. Por tanto, el FVW:Ag por sí solo no permitirá la detección de muchos defectos cualitativos. A su vez, el ensayo FVW:RCo puede sufrir imprecisión debido a la interferencia de la bilirrubina, hemoglobina, anticuerpos anti-IgG de ratón humanos (HAMA), factor reumatoide y triglicéridos. A la imprecisión del ensayo se suma además la variación genética y los polimorfismos en el sitio de unión a ristocetina. La exactitud del FVW:RCo es especialmente baja con concentraciones reducidas de FVW:Ag.

Dichos ensayos se basan en la unión de FVW al dominio extracelular de la glucoproteína Ibα. Sin embargo, en ausencia del complejo de glucoproteína Ibα-V-IX y la tensión de cizallamiento, el FVW se une a la glucoproteína Ibα con una afinidad de 4,5 μM relativamente débil. Las mutaciones naturales de la glucoproteína Ibα identificadas en pacientes con EVW de tipo plaquetario incluyen W230L, G233V, G233S, D235Y, M239V y M239I, de las que cada una incrementa la afinidad de unión entre el FVW y la glucoproteína Ibα [1] a [9].

Debido a la complejidad de la EVW, ninguna prueba de laboratorio puede proporcionar un diagnóstico completo. Actualmente, no se informa lo suficiente sobre el diagnóstico de EVW, de modo que la Organización Mundial de la Salud informa de su prevalencia en 1,14 por 100.000, mientras que los estudios de diagnóstico informan de una prevalencia de ~1 % de la población general. Una variedad de pruebas están disponibles para el diagnóstico, pero a menudo la opinión de los expertos tiene mucho peso. Las pruebas exactas y criterios de diagnóstico claramente definidos podrían mejorar los resultados médicos de muchos pacientes con una enfermedad que sigue sin diagnosticarse.

Los autores de la presente invención han identificado mutaciones novedosas en la horquilla β de Gp1bα que mejoran la unión al dominio A1 del FVW. Las proteínas de fusión que comprenden la glucoproteína plaquetaria Ibα son conocidas en la técnica [10-11]. Los autores de la invención también han desarrollado nuevos polipéptidos recombinantes que comprenden dichas mutaciones que se van a usar en el diagnóstico de EVW.

Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand humano, en el que dicho polipéptido recombinante comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, que comprende al menos una mutación seleccionada de G233T, D235V y K237V, en relación con SEQ ID NO: 19, que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 250 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o SEQ ID NO: 5, y que comprende además un dominio de oligomerización, en el que el dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en p53, GCN4, clatrina y marca pent, y en el que dicho polipéptido recombinante carece de un dominio transmembranario.

En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante tiene una afinidad de unión mayor por el factor de Von Willebrand de una muestra de sangre humana o muestra de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que no comprende la al menos una mutación pero que es de otro modo idéntico al polipéptido recombinante.

En algunos modos de realización, la Kd del polipéptido recombinante y del factor de Von Willebrand humano es menor de 1 µM, 750 nM, 500 nM, 250 nM o 100 nM. Kd se puede determinar, por ejemplo, por anisotropía de fluorescencia o resonancia de plasmón superficial, aunque el procedimiento para determinar Kd no es en particular limitante. El análisis de anisotropía de fluorescencia se puede realizar, por ejemplo, en el factor de Von Willebrand marcado fluorescentemente y polipéptido recombinante unido a partículas de rotación lenta. La resonancia de plasmón superficial se puede realizar, por ejemplo, en el factor de Von Willebrand unido a la superficie y polipéptido recombinante soluble.

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado comprende las mutaciones C65S y G233T; mutaciones C65S y D235V; mutaciones C65S y K237V; o mutaciones C65S, G233T y M239T, en relación con SEQ ID NO: 19.

El dominio extracelular modificado puede comprender opcionalmente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o SEQ ID NO: 5.

En algunos modos de realización, un polipéptido recombinante comprende además un dominio de reticulación. Un dominio de reticulación comprende uno o más de una cisteína C terminal, un dominio C terminal cargado negativamente y una proteína de unión a estreptavidina. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio de reticulación se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; o SEQ ID NO: 18.

En algunos modos de realización, un polipéptido recombinante comprende además una marca de afinidad. Una marca de afinidad opcionalmente se puede seleccionar de marca polihistidina, marca Snap, marca Clip, HaloTag, SnoopTag, SpyTag, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, marca Strep, glutatión-S-transferasa, marca FLAG, marca V5, marca Myc, marca HA, marca NE, AviTag, marca calmodulina, poliglutamato, marca S, marca SBP, Softag 1, Softag 3, marca TC, marca VSV, marca Xpress, Iso-peptag, proteína portadora de biotina carboxilo, marca de proteína fluorescente verde, marca Nus, marca tiorredoxina y el dominio Fc de un anticuerpo, aunque la elección de la marca de afinidad no es en particular limitante. En algunos modos de realización, la marca de afinidad es una marca polihistidina que comprende entre 6 y 8 residuos histidina. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos de la marca de afinidad se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; o SEQ ID NO: 46.

El polipéptido recombinante comprende además un dominio de oligomerización. Un dominio de oligomerización puede formar un dímero, trímero, tetrámero o pentámero tal como un homodímero, homotrímero, homotetrámero u homopentámero. El dominio de oligomerización del polipéptido recombinante como se reivindica se selecciona del grupo que consiste en p53, GCN4, clatrina y marca pent. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 13; o SEQ ID NO: 14.

En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41. La secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41.

También se divulga en el presente documento un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand humano, que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, en el que el dominio extracelular modificado comprende las mutaciones C65A, G233V y M239V, en relación

con SEQ ID NO: 19. También se divulga en el presente documento que la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 42. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; o SEQ ID NO: 28.

También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante tiene una afinidad de unión mayor por el factor de Von Willebrand de una muestra de sangre humana o muestra de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que no comprende las mutaciones C65A, G233V y M239V, en relación con SEQ ID NO: 19, pero que es de otro modo idéntico al polipéptido recombinante.

También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante comprende además un dominio de reticulación. Un dominio de reticulación opcionalmente comprende uno o más de una cisteína C terminal, un dominio C terminal cargado negativamente y una proteína de unión a estreptavidina. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio de reticulación se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; o SEQ ID NO: 18.

También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante comprende además una marca de afinidad. Una marca de afinidad opcionalmente se puede seleccionar de marca polihistidina, marca Snap, marca Clip, HaloTag, SnoopTag, SpyTag, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, marca Strep, glutatión-S-transferasa, marca FLAG, marca V5, marca Myc, marca HA, marca NE, AviTag, marca calmodulina, poliglutamato, marca S, marca SBP, Softag 1, Softag 3, marca TC, marca VSV, marca Xpress, Isopeptag, proteína portadora de biotina carboxilo, marca de proteína fluorescente verde, marca Nus, marca tiorredoxina y el dominio Fc de un anticuerpo, aunque la elección de la marca de afinidad no es en particular limitante. En algunos modos de realización, la marca de afinidad es una marca polihistidina que comprende entre 6 y 8 residuos histidina. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos de la marca de afinidad se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; o SEQ ID NO: 46. También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante comprende además un dominio de oligomerización. Un dominio de oligomerización puede formar un dímero, trímero, tetrámero o pentámero tal como un homodímero, homotrímero, homotetrámero u homopentámero. El dominio de oligomerización se puede derivar de p53, GCN4, clatrina, marca pent o el dominio Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en p53, GCN4, clatrina, marca pent o el dominio Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; o SEQ ID NO: 46

También se divulga en el presente documento un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand humano, que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, en el que el dominio extracelular modificado comprende la mutación A238V, en relación con SEQ ID NO: 19. Dichos polipéptidos recombinantes típicamente tienen una afinidad de unión menor por el factor de Von Willebrand de una muestra de sangre humana o de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que no comprende la mutación A238V pero que es de otro modo idéntico al polipéptido recombinante. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante es SEQ ID NO: 36.

También se divulga en el presente documento un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand humano, que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, en el que el dominio extracelular modificado comprende la mutación Δ(229-240), en relación con SEQ ID NO: 19. Dichos polipéptidos recombinantes típicamente tienen una afinidad de unión menor por el factor de Von Willebrand de una muestra de sangre humana o de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que no comprende la mutación Δ(229-240) pero que es de otro modo idéntico al polipéptido recombinante.

También se divulga en el presente documento que la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante es SEQ ID NO: 38.

También se divulga en el presente documento un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand humano, que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, en el que el dominio extracelular modificado comprende la mutación A238V o la mutación Δ(229-240), en relación con SEQ ID NO: 19. Dichos polipéptidos recombinantes típicamente tienen una afinidad de unión menor por el factor de Von Willebrand de una muestra de sangre humana o de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que no comprende la mutación A238V o la mutación Δ(229-240) pero que es de otro modo idéntico a la polipéptido recombinante.

También se divulga en el presente documento que la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante es SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38.

También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante comprende además un dominio de reticulación. Un dominio de reticulación opcionalmente comprende uno o más de una cisteína C terminal, un dominio C terminal cargado negativamente y una proteína de unión a estreptavidina. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio de reticulación se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; o SEQ ID NO: 18.

También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante comprende además una marca de afinidad. Una marca de afinidad opcionalmente se puede seleccionar de marca polihistidina, marca Snap, marca Clip, HaloTag, SnoopTag, SpyTag, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, marca Strep, glutatión-S-transferasa, marca FLAG, marca V5, marca Myc, marca HA, marca NE, AviTag, marca calmodulina, poliglutamato, marca S, marca SBP, Softag 1, Softag 3, marca TC, marca VSV, marca Xpress, Isopeptag, proteína portadora de biotina carboxilo, marca de proteína fluorescente verde, marca Nus, marca tiorredoxina y el dominio Fc de un anticuerpo, aunque la elección de la marca de afinidad no es en particular limitante. En algunos modos de realización, la marca de afinidad es una marca polihistidina que comprende entre 6 y 8 residuos histidina. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos de la marca de afinidad se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; o SEQ ID NO: 46.

También se divulga en el presente documento que dicho polipéptido recombinante comprende además un dominio de oligomerización. Un dominio de oligomerización puede formar un dímero, trímero, tetrámero o pentámero tal como un homodímero, homotrímero, homotetrámero u homopentámero. El dominio de oligomerización se puede derivar de p53, GCN4, clatrina, marca pent o el dominio Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en p53, GCN4, clatrina, marca pent o el dominio Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; o SEQ ID NO: 46

En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante comprende además un péptido líder. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido líder es SEQ ID NO: 20.

En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41.

Diversos aspectos de la invención se refieren a un polipéptido oligomérico que comprende al menos dos de los polipéptidos recombinantes descritos en el presente documento.

Diversos aspectos de la invención se refieren a una célula que comprende un polipéptido recombinante o un polipéptido oligomérico descrito en el presente documento. La célula opcionalmente se puede seleccionar de una célula CHO, HEK, BHK, NS0, Sp2/0, COS, C127, HT-1080, PER.C6, HeLa o Jurkat.

Diversos aspectos de la invención se refieren a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante de la invención. El ácido nucleico típicamente también comprende un promotor que se enlaza de forma funcional a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante (por ejemplo, de modo que el promotor pueda impulsar la transcripción de la secuencia de nucleótidos en una célula de expresión apropiada).

Diversos aspectos de la invención se refieren a una célula que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento (por ejemplo, *supra*). La célula puede ser una célula de expresión (por ejemplo, una célula CHO, HEK, BHK, NS0, Sp2/0, COS, C127, HT-1080, PER.C6, HeLa o Jurkat) o una célula de clonación (por ejemplo, *E. coli*).

Diversos aspectos de la invención se refieren a una composición que comprende un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico de la invención y un soporte sólido, en la que el polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico (a) se une covalente o no covalentemente al soporte sólido y/o (b) se une directa o indirectamente al soporte sólido.

El soporte sólido opcionalmente puede ser o bien comprender una partícula, una microesfera, una membrana, una superficie, un chip polipeptídico, una placa de microvaloración o la fase sólida de una columna de cromatografía. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el soporte sólido es una partícula de látex.

En algunos modos de realización, una composición comprende además factor de Von Willebrand (tal como factor de Von Willebrand humano).

En algunos modos de realización, una composición comprende un soporte sólido que comprende una pluralidad de partículas o microesferas, y el factor de Von Willebrand reticula las partículas o microesferas de la pluralidad de partículas o microesferas.

En algunos modos de realización, una composición comprende además plasma sanguíneo (tal como plasma sanguíneo humano).

En algunos modos de realización, una composición comprende además plaquetas (tales como plaquetas humanas).

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 contiene fotografías de geles electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) que confirman la expresión y pureza de diversos polipéptidos recombinantes. Los carriles de los geles se numeran como sigue: (1) estándar de peso molecular; (2) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65S y G233T, dominio de dimerización Fc de IgG1 y marca de afinidad 8-His (punta de flecha; la banda inferior corresponde al dominio constante de IgG1 murina) (SEQ ID NO: 21); (3) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65S y G233T, dominio de tetramerización de p53 y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 22); (4) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65S, G233V y M239V, dominio de tetramerización de p53 y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 23); (5) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65S y G233T, marca de afinidad 6-His y cisteína C terminal (SEQ ID NO: 24); (6) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65S y G233T, proteína de unión a estreptavidina y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 25); (7) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65A, G233V y M239V, dominio de tetramerización de p53 y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 26); (8) estándar de peso molecular; (9) estándar de peso molecular; (10) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65A, G233V y M239V y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 27); (11) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones C65A, G233V y M239V, dominio C terminal cargado negativamente y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 28); (12) polipéptido recombinante que comprende las mutaciones G233V y M239V, marca FLAG y marca de afinidad 6-His (SEQ ID NO: 29).

La FIGURA 2 es un gráfico de barras que representa las constantes de disociación (Kd; eje y) como se evalúa por anisotropía de fluorescencia entre el dominio del factor A1 de Von Willebrand recombinante marcado fluorescentemente y polipéptidos diméricos unidos a partícula que comprenden dos subunidades polipeptídicas recombinantes comprendiendo cada una un dominio de dimerización Fc y un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, que incluye mutaciones como se indica en el eje x y la mutación C65S, o un control de polipéptido monomérico unido a partícula (G233V, M239V - noFc (SEQ ID NO: 35)). Los polipéptidos diméricos evaluados corresponden a SEQ ID NO: 38 (Δ(229-240)); SEQ ID NO: 37 (WT); SEQ ID NO: 36 (A238V); SEQ ID NO: 34 (G233V, M239V); SEQ ID NO: 32 (G233V); SEQ ID NO: 33 (G233T, M239T); SEQ ID NO: 21 (G233T); SEQ ID NO: 30 (D235V); SEQ ID NO: 31 (K237V). El polipéptido dimérico que no incluyó una mutación mostró una Kd de aproximadamente 1,25 µM. Los polipéptidos recombinantes que incluyeron una de las mutaciones G233T, D235V o K237V mostraron cada uno Kd menores de 500 nM (por ejemplo, ~67 nM, ~250 nM y ~300 nM, respectivamente, para mutantes individuales).

La FIGURA 3 es un gráfico lineal de un análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore del factor de Von Willebrand unido a superficie y un polipéptido recombinante soluble que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα que incluye la mutación G233T. Este análisis sugiere que la constante de disociación (Kd) entre el factor de Von Willebrand y el polipéptido recombinante G233T fue de 58 nM, lo que confirma las mediciones de Kd de anisotropía de fluorescencia de la FIGURA 2, que midió una Kd de 67 nM para el mutante G233T.

La FIGURA 4A es un diagrama del ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) usado para generar los datos de la FIGURA 4B-4D. Se recubrió un soporte sólido con anticuerpo anti-glucoproteína Ibα (anti-CD42b), que se usó para inmovilizar el polipéptido recombinante que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα (CD42b; GPIbα; construcciones GP1b). A continuación, se puso en contacto el soporte sólido con plasma sanguíneo humano, calibradores del factor de Von Willebrand o controles del factor de Von Willebrand. A continuación, se puso en contacto el soporte sólido con un anticuerpo anti-factor de Von Willebrand humano de conejo policlonal al que se conjugó peroxidasa de rábano picante (HRP). A continuación se puso en contacto la composición con un sustrato que se puede convertir en un producto por HRP con una absorbancia fuerte a 450 nm, y se midió la absorbancia.

La FIGURA 4B es un gráfico de barras que representa los resultados para el ELISA de la FIGURA 4A usando un polipéptido recombinante que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα que incluye las mutaciones C65S y D235V (SEQ ID NO: 30). Las primeras cuatro muestras en el eje x

corresponden a muestras con enfermedad de Von Willebrand conocida tipo 1, tipo 2B, tipo 3 y tipo 1, respectivamente (es decir, GK1422 (1); GH1423 (2B); GK1419 (3); GK1425 (1)). Las muestras quinta y sexta son muestras de control que comprenden plasma humano mezclado (es decir, DG-C1; DG-C2). La séptima muestra es un control de suero sanguíneo de cabra (que carece del factor de Von Willebrand). Las muestras octava a decimoséptima son muestras de plasma sanguíneo humano sin enfermedad de Von Willebrand ("normal"). Las muestras decimoctava a vigésimo segunda corresponden a una dilución en serie de un estándar de referencia de plasma humano mezclado desde ninguna dilución (1:1) hasta una dilución de 16 veces (1:16). El eje y corresponde a la absorbancia (Abs) a 450 nm, y el incremento en la absorbancia corresponde al incremento en el factor de Von Willebrand unido.

La FIGURA 4C es un gráfico de barras que representa los resultados para el ELISA de la FIGURA 4A usando un polipéptido recombinante que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα que incluye las mutaciones C65S y K237V (SEQ ID NO: 31). Las primeras cuatro muestras en el eje x corresponden a muestras con enfermedad de Von Willebrand conocida tipo 1, tipo 2B, tipo 3 y tipo 1, respectivamente (es decir, GK1422 (1); GH1423 (2B); GK1419 (3); GK1425 (1)). Las muestras quinta y sexta son muestras de control que comprenden plasma humano mezclado (es decir, DG-C1; DG-C2). La séptima muestra es un control de suero sanguíneo de cabra (que carece del factor de Von Willebrand). Las muestras octava a decimoséptima son muestras de plasma sanguíneo humano sin enfermedad de Von Willebrand ("normal"). Las muestras decimoctava a vigésimo segunda corresponden a una dilución en serie de un estándar de referencia de plasma humano mezclado desde ninguna dilución (1:1) hasta una dilución de 16 veces (1:16). El eje y corresponde a la absorbancia (Abs) a 450 nm, y el incremento en la absorbancia corresponde al incremento en el factor de Von Willebrand unido.

La FIGURA 4D es un gráfico de barras que representa los resultados para el ELISA de la FIGURA 4A usando un polipéptido recombinante que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα que incluye las mutaciones C65S y G233T (SEQ ID NO: 21). Las primeras cuatro muestras en el eje x corresponden a muestras con enfermedad de Von Willebrand conocida tipo 1, tipo 2B, tipo 3 y tipo 1, respectivamente (es decir, GK1422 (1); GH1423 (2B); GK1419 (3); GK1425 (1)). Las muestras quinta y sexta son muestras de control que comprenden plasma humano mezclado (es decir, DG-C1; DG-C2). La séptima muestra es un control de suero sanguíneo de cabra (que carece del factor de Von Willebrand). Las muestras octava a decimoséptima son muestras de plasma sanguíneo humano sin enfermedad de Von Willebrand ("normal"). Las muestras decimoctava a vigésimo segunda corresponden a una dilución en serie de un estándar de referencia de plasma humano mezclado desde ninguna dilución (1:1) hasta una dilución de 16 veces (1:16). El eje y corresponde a la absorbancia (Abs) a 450 nm, y el incremento en la absorbancia corresponde al incremento en el factor de Von Willebrand unido.

Descripción detallada

La siguiente descripción pretende simplemente ilustrar diversos modos de realización de la presente divulgación.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra “comprende”, o variaciones tales como “comprenden” o “comprendiendo”, implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros establecidos pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Cada modo de realización en la presente memoria descriptiva se debe aplicar *mutatis mutandis* a cualquier otro modo de realización a menos que expresamente se establezca de otro modo.

Los siguientes términos, a menos que se indique de otro modo, se entenderán que tienen los siguientes significados: Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a una biomolécula, por ejemplo, un gen o proteína, que (1) se ha retirado de su entorno natural, (2) no se asocia con todo o una porción de un polinucleótido en el que el gen se encuentra en la naturaleza, (3) se enlaza de forma funcional a un polinucleótido al que no se enlaza en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza. El término "recombinante" se puede usar en referencia a aislados de ADN clonados, análogos de polinucleótidos sintetizados químicamente o análogos de polinucleótidos que se sintetizan biológicamente por sistemas heterólogos, así como proteínas y/o ARNm codificados por dichos ácidos nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a cualquier material compuesto de ADN o ARN. Los ácidos nucleicos se pueden preparar sintéticamente o por células vivas.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a una cadena polimérica de nucleótidos. El término incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico o sintético) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm o ARN sintético), así como análogos de ADN o ARN que contienen análogos de

nucleótidos no naturales, enlaces internucleosídicos no naturales o ambos. El ácido nucleico puede tener cualquier conformación topológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, tricatenario, cuadruplexado, parcialmente bicatenario, ramificado, en forma de horquilla, circular o en una conformación de candado.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a moléculas biológicas grandes, o macromoléculas, que consisten en una o más cadenas de residuos de aminoácidos. Muchas proteínas son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas y son vitales para el metabolismo. Las proteínas también tienen funciones estructurales o mecánicas, tales como actina y miosina en el músculo y las proteínas en el citoesqueleto, que forman un sistema de estructura que mantiene la conformación celular. Otras proteínas son importantes en la señalización celular, respuestas inmunitarias, adhesión celular y el ciclo celular. Sin embargo, las proteínas pueden ser completamente artificiales o recombinantes, es decir, no existir de forma natural en un sistema biológico.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a proteínas tanto naturales como no naturales, y fragmentos, mutantes, derivados y análogos de las mismas. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. Un polipéptido puede comprender varios dominios diferentes de los que cada uno tiene una o más actividades distintas.

Los términos "secuencia natural" o "gen natural" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a una secuencia que es natural o que se produce de forma natural en una célula huésped. En algunos modos de realización, la secuencia natural se refiere a una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de genomanipulación de proteínas. La secuencia natural puede codificar una proteína tanto homóloga como heteróloga. Una proteína homóloga es una que la célula huésped produciría sin intervención. Una proteína heteróloga es una que la célula huésped no produciría si no fuera por la intervención.

Los términos "secuencia modificada" y "genes modificados" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a una secuencia que incluye al menos una sustitución, deleción, inserción o interrupción de una secuencia de ácido nucleico natural.

Como se usa en el presente documento, los términos "secuencia mutante" y "gen mutante" se usan de manera intercambiable y se refieren a una secuencia que tiene una alteración en al menos un codón que se produce en la secuencia natural de una célula huésped. Dicha alteración en al menos un codón también se denomina "mutación". El producto de expresión de la secuencia mutante es una proteína con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la natural. El producto de expresión puede tener una alteración en la capacidad funcional (por ejemplo, potenciación en la afinidad de unión).

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, líquido peritoneal, LCR, saliva u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, linfocitos B enriquecidos a partir de muestras de sangre y células cultivadas (por ejemplo, linfocitos B de un sujeto). Una muestra también puede incluir una biopsia o una muestra de tejido que incluye tejido neuronal. Todavía en otros aspectos, una muestra puede comprender células completas y/o un lisado de las células.

Diversos aspectos de los modos de realización divulgados en el presente documento se refieren a nuevos polipéptidos recombinantes que comprenden mutaciones para un dominio extracelular de glucoproteína Ibα, que no es conocido que se produzcan en la naturaleza, que incrementan su afinidad de unión por FVW en relación con el natural en ausencia tanto del complejo de glucoproteína Ibα-V-IX como de la tensión de cizallamiento. Diversos aspectos de los modos de realización divulgados en el presente documento se refieren a polipéptidos recombinantes que comprenden un dominio extracelular de glucoproteína Ibα y un dominio de oligomerización que incrementa la afinidad de unión del polipéptido recombinante por FVW en relación con polipéptidos que carecen de un dominio de oligomerización en ausencia tanto del complejo de glucoproteína Ibα-V-IX como de la tensión de cizallamiento.

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a la determinación de que los polipéptidos recombinantes novedosos divulgados en el presente documento se pueden expresar de forma robusta y plegar apropiadamente y son susceptibles de ensayos funcionales complejos. En particular, muchos de los polipéptidos recombinantes divulgados en el presente documento pueden distinguir pequeños defectos en la coagulación y atribuir estos defectos al FVW.

I. Polipéptidos recombinantes

La presente invención se refiere a un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand (FVW) humano que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα (GPIbα) como se cita en las reivindicaciones.

El término "se une específicamente" se refiere a una interacción que tiene una constante de disociación (Kd) de no más de 10 µM, tal como no más de aproximadamente 6 µM, 5 µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM, 1 µM, 950 nM, 900 nM, 850 nM, 800 nM, 750 nM, 700 nM, 650 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 450 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM o 50 nM, o bien menos de aproximadamente 10 µM, 6 µM, 5 µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM, 1 µM, 950 nM, 900 nM, 850 nM, 800 nM, 750 nM, 700 nM, 650 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 450 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM o 50 nM, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, tales como en plasma sanguíneo humano o en HEPES o tampón fosfato, y, por ejemplo, entre el polipéptido recombinante (o un polipéptido oligomérico del mismo) y FVW humano natural. Si un polipéptido recombinante se une específicamente a FVW humano con una constante de disociación específica se puede determinar, por ejemplo, por anisotropía de fluorescencia o resonancia de plasmón superficial como se describe en el presente documento *infra.*

Un polipéptido recombinante típicamente tiene una longitud de aproximadamente 250 aminoácidos a aproximadamente 1000 aminoácidos tal como de aproximadamente 250 a aproximadamente 550, de aproximadamente 500 a aproximadamente 750, de aproximadamente 600 a aproximadamente 800, de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 250 a aproximadamente 300, de aproximadamente 290 a aproximadamente 350, de aproximadamente 300 a aproximadamente 400, de aproximadamente 350 a aproximadamente 450, de aproximadamente 400 a aproximadamente 500, de aproximadamente 450 a aproximadamente 550, de aproximadamente 500 a aproximadamente 600 aminoácidos, de aproximadamente 550 a aproximadamente 650, de aproximadamente 600 a aproximadamente 700, de aproximadamente 650 a aproximadamente 750, de aproximadamente 700 a aproximadamente 800, de aproximadamente 750 a aproximadamente 850, de aproximadamente 800 a aproximadamente 900, de aproximadamente 850 a aproximadamente 950, o de aproximadamente 900 a aproximadamente 1000 aminoácidos.

Un polipéptido recombinante típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 100 kDa tal como de aproximadamente 25 a aproximadamente 55, de aproximadamente 50 a aproximadamente 75, de aproximadamente 60 a aproximadamente 80, de aproximadamente 75 a aproximadamente 100, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30, de aproximadamente 29 a aproximadamente 35, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40, de aproximadamente 35 a aproximadamente 45, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50, de aproximadamente 45 a aproximadamente 55, de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 aminoácidos, de aproximadamente 55 a aproximadamente 65, de aproximadamente 60 a aproximadamente 70, de aproximadamente 65 a aproximadamente 75, de aproximadamente 70 a aproximadamente 80, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85, de aproximadamente 80 a aproximadamente 90, de aproximadamente 85 a aproximadamente 95, o de aproximadamente 90 a aproximadamente 100 kDa.

El polipéptido recombinante de la invención puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41. El polipéptido recombinante puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41, es decir, en el que la secuencia de aminoácidos completa del polipéptido recombinante no es una secuencia de aminoácidos natural. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante de la invención tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41.

A. Dominios extracelulares modificados

Los dominios extracelulares modificados de GPIbα son dominios de unión a FVW de GPIbα, correspondientes a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19, o una subsecuencia de la misma, que contienen una o más mutaciones que incluyen al menos una mutación de "ganancia de función" o de "pérdida de función". Las mutaciones de ganancia de función y de pérdida de función incrementan o disminuyen, respectivamente, la afinidad de unión del dominio extracelular modificado por el FVW con relación a un dominio extracelular natural que abarca la misma secuencia de aminoácidos de GPIbα que el dominio extracelular modificado. Las mutaciones de ganancia de función que no es conocido que se produzcan en la naturaleza incluyen G233T, D235V y K237V (es decir, en las que los aminoácidos se numeran como en SEQ ID NO: 19). Las mutaciones de pérdida de función que no es conocido que se produzcan en la naturaleza incluyen A238V o A(229-240) (es decir, como se numera en SEQ ID NO: 19).

Un dominio extracelular modificado de GPIbα puede incluir una o más mutaciones seleccionadas de G233T, D235V y K237V. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante o un polipéptido oligomérico del mismo tiene una afinidad de unión mayor por el FVW de una muestra de sangre humana o una muestra de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que tanto (a) comprende la misma subsecuencia de GPIbα que el polipéptido recombinante como (b) carece de la una o más mutaciones (por ejemplo, en el que el polipéptido recombinante y el polipéptido de control son idénticos excepto por la presencia de la una o más

mutaciones en el polipéptido recombinante y la carencia de la una o más mutaciones en el polipéptido de control). En algunos modos de realización, la Kd del polipéptido recombinante o un polipéptido oligomérico del mismo y el FVW humano es menor de 4 µM, 3 µM, 2 µM, 1 µM, 950 nM, 900 nM, 850 nM, 800 nM, 750 nM, 700 nM, 650 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 450 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM o 50 nM, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, tales como en plasma sanguíneo humano o en HEPES o tampón fosfato. La Kd se puede determinar, por ejemplo, por un análisis de anisotropía de fluorescencia de FVW marcado fluorescentemente y polipéptido recombinante unido a partículas de rotación lenta o por un análisis de resonancia de plasmón superficial de FVW unido a superficie y polipéptido recombinante soluble, aunque también son útiles varios procedimientos diferentes para determinar la Kd entre un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico del mismo y FVW.

Un dominio extracelular modificado de gpibα puede incluir la mutación a238v.

Un dominio extracelular modificado típicamente incluye suficiente estructura primaria de GPIbα humana para unirse específicamente a FVW humano. Un dominio extracelular modificado puede tener, por ejemplo, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 250, 260, 270, 280 o 290 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19. Un dominio extracelular modificado puede tener al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 250, 260, 270, 280 o 290 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o SEQ ID NO: 5. El dominio extracelular modificado puede tener un 100 % de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 250, 260, 270, 280 o 290 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o SEQ ID NO: 5. El dominio extracelular modificado puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o SEQ ID NO: 5.

Un dominio extracelular modificado típicamente incluye una estructura secundaria y terciaria similar al dominio de unión a FVW de GPIbα humana natural, incluyendo el patrón de enlace disulfuro intramolecular del GPIbα humana natural. La estructura secundaria y terciaria de GPIbα humana natural existe en un equilibrio dinámico entre conformaciones que tienen baja afinidad por FVW y conformaciones que tienen alta afinidad por FVW. En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado favorece conformaciones que tienen alta afinidad por el FVW como se evalúa, por ejemplo, por la medición de una constante de disociación entre el polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico del mismo y FVW.

En algunos modos de realización, un dominio extracelular modificado incluye glucosilación y/u otras modificaciones postraduccionales que se encuentran en proteínas GPIbα humanas naturales. En algunos modos de realización, un dominio extracelular modificado corresponde a una glucoforma de GPIbα humana natural que existe en la naturaleza.

Un polipéptido recombinante típicamente carece de la región extracelular intrínsecamente desordenada correspondiente a los aminoácidos 291-517 de GPIbα, que siguen el dominio de unión a FVW establecido en SEQ ID NO: 19. Un polipéptido recombinante preferentemente carece del dominio transmembranario de GPIbα, correspondiente a los aminoácidos 518-540, que siguen a la región extracelular intrínsecamente desordenada. Un polipéptido recombinante típicamente carece de cualquier dominio transmembranario. Un polipéptido recombinante preferentemente carece del dominio citosólico de GPIbα, que sigue al dominio transmembranario en GPIbα natural.

En determinados modos de realización preferentes, el dominio extracelular modificado comprende una mutación en C65 tal como C65S o C65A (es decir, como se numera el aminoácido C65 en SEQ ID NO: 19).

Un dominio extracelular modificado puede incluir, por ejemplo, mutaciones C65S y G233T, mutaciones C65S y D235V, mutaciones C65S y K237V, o mutaciones C65S, G233T y M239T.

También se divulga en el presente documento un dominio extracelular modificado que puede incluir, por ejemplo, mutaciones C65A, G233V y M239V. También se divulga en el presente documento un dominio extracelular modificado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 42.

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado incluye una mutación de un aminoácido de GPIbα natural a un aminoácido ramificado en β (por ejemplo, valina o treonina), en el que el aminoácido de GPIbα natural no es un aminoácido ramificado en β. En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado incluye una mutación de un aminoácido de GPIbα natural a un aminoácido que comprende un hidroxilo (por ejemplo, treonina), en el que el aminoácido de GPIbα natural no comprende un hidroxilo. En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado incluye una mutación de un aminoácido de GPIbα natural a un aminoácido ramificado en β que comprende un hidroxilo (por ejemplo, treonina), en el que el aminoácido de GPIbα natural no es un aminoácido ramificado en β que comprende un hidroxilo.

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado incluye una mutación que no es conocido que se produzca en la naturaleza.

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado tiene una carga electrostática a pH fisiológico que difiere de la carga electrostática de un dominio extracelular natural que abarca el mismo tramo de aminoácidos que el dominio extracelular modificado (por ejemplo, en el que la carga electrostática difiere del natural en al menos aproximadamente 0,5, tal como en aproximadamente 1,0).

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado incluye una mutación de un aminoácido GPIbα natural a un aminoácido que tiene una entropía conformacional menor que el aminoácido natural tal como una mutación de glicina a treonina.

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado carece de una o más mutaciones seleccionadas de la mutación para el número de aminoácido 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240. 241, 242, 243 o 244 de SEQ ID NO: 19.

En algunos modos de realización, el dominio extracelular modificado carece de una o más mutaciones seleccionadas de C65A, N226V, Y228V, W230L, K231V, Q232V, G233V, G233S, D235V, D235Y, K237V, A238V, M239S, M239V, M239I, T240V y A244V.

También se divulga en el presente documento que el dominio extracelular modificado comprende la mutación A238V, y el polipéptido recombinante tiene una afinidad de unión menor por el FVW de una muestra de sangre humana o una muestra de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que tanto (a) comprende la misma subsecuencia de GPIbα que el polipéptido recombinante como (b) carece de la mutación A238V (por ejemplo, en el que el polipéptido recombinante y el polipéptido de control son idénticos excepto por la presencia de la mutación A238V en el polipéptido recombinante y la carencia de la mutación A238V en el polipéptido de control). También se divulga en el presente documento que el dominio extracelular modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

También se divulga en el presente documento que el dominio extracelular modificado comprende la deleción de los aminoácidos 229 a 240 (mutación Δ(229-240)), en relación con SEQ ID NO: 19, y el polipéptido recombinante tiene una afinidad de unión menor por el FVW de una muestra de sangre humana o una muestra de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que tanto (a) comprende la misma subsecuencia de GPIbα que el polipéptido recombinante como (b) carece de la mutación Δ(229-240) (por ejemplo, en el que el polipéptido recombinante y el polipéptido de control son idénticos excepto por la presencia de la mutación Δ(229-240) en el polipéptido recombinante y la carencia de la mutación Δ(229-240) en el polipéptido de control. También se divulga en el presente documento que el dominio extracelular modificado comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

B. Dominios de reticulación

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a un polipéptido recombinante que comprende un dominio de reticulación. Un dominio de reticulación típicamente permite que el polipéptido recombinante se reticule covalente o no covalentemente a una molécula soluble o soporte sólido.

Los autores de la invención han descubierto y divulgan que las químicas tradicionales para reticular aleatoriamente aminas primarias (por ejemplo, lisina) o carboxilos (por ejemplo, aspartato, glutamato, extremo C) de un polipéptido recombinante a soportes sólidos u otros componentes de un ensayo tal como por químicas de 1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) o N-hidroxisuccinimida (NHS) dan como resultado defectos funcionales, lo que reduce la exactitud y precisión del ensayo. La reticulación aleatoria es a menudo una estrategia superior para el desarrollo de ensayo porque la reticulación aleatoria proporciona una población de moléculas reticuladas en múltiples orientaciones diferentes, lo que permite interacciones entre cada superficie de las moléculas reticuladas y sus compañeros de unión en un ensayo. La reticulación direccional es a menudo inferior a la reticulación aleatoria para el desarrollo de ensayo porque la reticulación direccional enmascara una superficie de la molécula reticulada, en particular cuando la molécula se reticula a un soporte sólido, y puede afectar a la estructura y la dinámica de cada molécula de forma uniforme, así como a sus interacciones con sus compañeros de unión, introduciendo de este modo un error sistemático en un ensayo. La reticulación direccional también es en general laboriosa y costosa en relación con la reticulación aleatoria, por ejemplo, porque la reticulación direccional requiere tanto el diseño, clonación, expresión y análisis del polipéptido recombinante como la validación de ensayos que utilizan el polipéptido recombinante reticulado direccionalmente sin garantía de que cualquier diseño evite errores sistemáticos.

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren al hallazgo de que la reticulación de un polipéptido recombinante como se describe en el presente documento a un soporte sólido mediado por el extremo C del polipéptido recombinante permite ensayos con precisión y exactitud superiores en relación con la reticulación aleatoria.

En algunos modos de realización, un polipéptido recombinante comprende un dominio de reticulación. El dominio de reticulación puede comprender opcionalmente un dominio C terminal cargado negativamente. Un dominio C terminal cargado negativamente típicamente incluye un tramo de 3 a 20 aminoácidos (es decir, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos) que tiene una carga negativa neta a pH neutro tal como una carga neta menor de aproximadamente -1, -2, -3, -4, -5 o -6. El término "dominio C terminal cargado negativamente" no quiere decir necesariamente que la secuencia de aminoácidos del dominio C terminal cargado negativamente incluye el aminoácido del extremo C de un polipéptido recombinante, aunque un dominio C terminal cargado negativamente puede incluir el aminoácido C terminal. "C terminal" en cambio se refiere a la posición del dominio cargado negativamente en relación con el dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα en un polipéptido recombinante, es decir, un dominio C terminal cargado negativamente es C terminal en relación con el dominio extracelular modificado.

El dominio C terminal cargado negativamente típicamente incluye aminoácidos tales como glutamato y aspartato (por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 glutamatos y aspartatos) y carece de aminoácidos tales como arginina, lisina e histidina (por ejemplo, no más de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 argininas, lisinas e histidinas). El dominio C terminal cargado negativamente también puede incluir opcionalmente aminoácidos hidrófilos pequeños que muestran un alto grado de entropía conformacional (por ejemplo, glicina, alanina, serina) y/o prolina, que son útiles para desfavorecer la estructura secundaria.

En algunos modos de realización, el dominio de reticulación puede comprender un dominio C terminal cargado negativamente y una marca de afinidad. En algunos modos de realización, la marca de afinidad es una marca polihistidina. En polipéptidos recombinantes que incluyen tanto una marca polihistidina como un dominio C terminal cargado negativamente, el dominio C terminal cargado negativamente se sitúa típicamente entre el dominio extracelular modificado y la marca polihistidina. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos que incluye un dominio C terminal cargado negativamente y una marca polihistidina se muestra en SEQ ID NO: 17.

En polipéptidos recombinantes que incluyen tanto una marca de afinidad como un dominio C terminal cargado negativamente, el dominio C terminal cargado negativamente se sitúa típicamente entre el dominio extracelular modificado y la marca de afinidad.

Un dominio de reticulación puede comprender opcionalmente una cisteína C terminal. Las cisteínas C terminales son útiles para reticular polipéptidos recombinantes con un soporte sólido u otro componente de un ensayo, por ejemplo, usando química de tiol-maleimida o una interacción tiol-oro. En algunos modos de realización, el dominio de reticulación puede comprender una cisteína C terminal y una marca de afinidad. En algunos modos de realización, la marca de afinidad es una marca polihistidina. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos que comprende una marca polihistidina y una cisteína C terminal se expone en SEQ ID NO: 16.

El término "cisteína C terminal" no quiere decir necesariamente que la cisteína C terminal sea el aminoácido C terminal de un polipéptido recombinante, aunque una cisteína C terminal puede ser el aminoácido C terminal. "C terminal" en cambio se refiere a la posición de la cisteína C terminal en relación con el dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα en un polipéptido recombinante, es decir, una cisteína C terminal es C terminal en relación con el dominio extracelular modificado.

Un dominio de reticulación puede comprender opcionalmente una proteína de unión a estreptavidina o un equivalente funcional de la misma. La proteína de unión a estreptavidina es útil para reticular no covalentemente polipéptidos recombinantes a estreptavidina. En algunos modos de realización, el dominio de reticulación puede comprender una proteína de unión a estreptavidina y una marca de afinidad. En algunos modos de realización, la marca de afinidad es una marca polihistidina. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos que comprende proteína de unión a estreptavidina y una marca polihistidina se expone en SEQ ID NO: 18.

También se divulga en el presente documento que el dominio de reticulación puede comprender el dominio Fc de un anticuerpo. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos que comprende el dominio Fc de un anticuerpo se expone en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

Un dominio de reticulación de acuerdo con la presente invención puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; o SEQ ID NO: 18.

C. Marcas de afinidad

Un polipéptido recombinante puede incluir opcionalmente una marca de afinidad. Las marcas de afinidad son útiles para la purificación y también pueden ser útiles en ensayos que utilizan un polipéptido recombinante. Las marcas de afinidad ejemplares incluyen marca polihistidina, marca Snap, marca Clip, HaloTag, SnoopTag, SpyTag, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, marca Strep, glutatión-S-transferasa, marca FLAG, marca V5, marca Myc, marca HA, marca NE, AviTag, marca calmodulina, poliglutamato, marca S, marca SBP, Softag 1, Softag 3, marca TC, marca VSV, marca Xpress, Isopeptag, proteína portadora de biotina

carboxilo, marca de proteína fluorescente verde, marca Nus, marca tiorredoxina y el dominio Fc de un anticuerpo, aunque la elección de la marca de afinidad no es en particular limitante. No obstante, un polipéptido recombinante puede carecer de una marca de afinidad, por ejemplo, si la marca de afinidad se retira después de su uso o si el polipéptido recombinante se purifica usando una estrategia que no requiere una marca de afinidad. Una marca de afinidad ejemplar es una marca polihistidina, que típicamente incluye una secuencia de aminoácidos que comprende seis u ocho histidinas consecutivas aunque el número de residuos histidina no es en particular limitante (véanse, por ejemplo, SEQ ID NO: 15-18, 43, 44, 46). En algunos modos de realización, la marca de afinidad puede comprender un conector de glicina (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 44). En algunos modos de realización, la marca de afinidad puede comprender el dominio Fc de un anticuerpo (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 46). En algunos modos de realización, la marca de afinidad es el dominio Fc de un anticuerpo (véanse, por ejemplo, SEQ ID NO: 11 o 12).

Una marca de afinidad de acuerdo con la presente invención puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; o SEQ ID NO: 46.

C. Dominios de oligomerización

Un polipéptido recombinante puede comprender opcionalmente un dominio de oligomerización. Un dominio de oligomerización permite la formación de oligómeros tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y/u oligómeros de orden superior. Un dominio de oligomerización puede favorecer una estequiometría específica, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros, o un dominio de oligomerización pueden permitir una distribución de oligómeros que tienen diferentes estequiometrías. Se puede diseñar un dominio de oligomerización para formar homooligómeros, aunque la distinción entre homooligómeros y heterooligómeros no es en particular limitante. En algunos modos de realización, el dominio de oligomerización puede formar un homodímero, homotrímero, homotetrámero u homopentámero, por ejemplo, en el que la oligomerización de un polipéptido recombinante da como resultado un oligómero predominantemente monodisperso. El dominio de oligomerización puede ser, por ejemplo, un dominio de oligomerización de p53, GCN4, clatrina o marca pent.

Un dominio de oligomerización proporciona varias ventajas para polipéptidos recombinantes que se usan en ensayos. Un dominio de oligomerización puede orientar polipéptidos recombinantes entre sí, lo que puede aproximar, por ejemplo, la orientación de GPIbα natural en la bicapa lipídica de una plaqueta. Un dominio de oligomerización también puede incrementar la afinidad de un polipéptido recombinante por FVW, por ejemplo, porque FVW es multivalente, y la unión de los múltiples dominios extracelulares modificados de un polipéptido oligomérico a FVW tiene inherentemente una afinidad de unión mayor que la unión de un dominio extracelular modificado único a FVW.

También se divulga en el presente documento un dominio de oligomerización que incluye la secuencia de aminoácidos de una región bisagra del dominio Fc de anticuerpo. Además de los beneficios de los dominios de oligomerización descritos anteriormente, los dominios Fc a menudo incrementan la expresión y/o secreción de un polipéptido recombinante en células de expresión.

La especie de un dominio Fc de anticuerpo se puede seleccionar en base al uso deseado de un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico. Por ejemplo, la especie de dominio Fc de anticuerpo se puede seleccionar de modo que un reactivo específico seleccione o ignore el dominio Fc de anticuerpo en un ensayo. Un dominio Fc de ratón puede ser útil, por ejemplo, si no se usa ningún anticuerpo secundario anti-IgG de ratón para detectar otros anticuerpos de ratón en un ensayo. De forma similar, un dominio Fc de ratón puede ser útil para reticular un polipéptido recombinante a un soporte sólido u otro componente de un ensayo usando un anticuerpo anti-IgG de ratón. La especie de dominio Fc puede ser ser humano, ratón, conejo, rata, hámster, cobaya, cabra, oveja, caballo, pollo o una quimera de cualquiera de las especies anteriores, aunque la especie de dominio Fc no es en particular limitante.

Un dominio de oligomerización ejemplar divulgado en el presente documento es el dominio Fc de IgG de ratón que comprende la región bisagra, lo que permite que los polipéptidos recombinantes que comprenden el dominio de oligomerización formen un homodímero covalente. Un dominio Fc de IgG de ratón dimérico divulgado en el presente documento puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

Los dominios Fc también pueden ayudar a la purificación de un polipéptido recombinante ya que los procedimientos para purificar polipéptidos que comprenden dominios Fc son bien conocidos. Los dominios Fc también pueden actuar como dominios de reticulación. Los dominios Fc también pueden actuar como marcas de afinidad.

Un dominio de oligomerización ejemplar de la invención es el dominio de tetramerización de p53. Un dominio de tetramerización de p53 puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 o una secuencia

de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10.

Otro dominio de oligomerización ejemplar de la invención es el dominio de trimerización de GCN4. Un dominio de trimerización de GCN4 puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13. Un polipéptido recombinante que comprende una secuencia similar a GCN4 se puede diseñar, por ejemplo, para que sea un trímero paralelo. Se pueden diseñar secuencias similares a GCN4 alternativas como es conocido en la técnica para preparar oligómeros diméricos, triméricos y tetraméricos con organización paralela o bien antiparalela de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harbury, Zhang, Kim, and Alber, "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants", Science (1993) 262:1401).

Otro dominio de oligomerización ejemplar de la invención es el dominio de trimerización de clatrina. Un dominio de trimerización de clatrina puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14.

En algunos modos de realización, el dominio de oligomerización puede incluir una marca de afinidad.

Un dominio de oligomerización de acuerdo con la presente invención puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 13; o SEQ ID NO: 14.

En algunos modos de realización, la constante de disociación (Kd) entre FVW y un polipéptido recombinante que comprende un dominio de oligomerización es menor que la constante de disociación entre FVW y un polipéptido de control tanto (a) que comprende la misma subsecuencia de GPIbα o subsecuencia mutante de la misma que el polipéptido recombinante y (b) que carece del dominio de oligomerización (por ejemplo, en el que el polipéptido de control y el polipéptido recombinante son idénticos excepto por la presencia del dominio de oligomerización en el polipéptido recombinante y la carencia del dominio de oligomerización en el polipéptido de control). La diferencia en la constante de disociación (Kd) entre dichos polipéptidos recombinantes y polipéptidos de control típicamente es atribuible principal o únicamente a los estados de oligomerización de los polipéptidos recombinantes y polipéptidos de control.

Otros dominios de oligomerización son conocidos en la técnica y la elección específica del dominio de oligomerización no es en particular limitante. La estreptavidina, por ejemplo, puede ser un dominio de oligomerización en particular útil porque forma un tetrámero y también se une a biotina, lo que puede ayudar a la purificación y también puede ser útil en diversos ensayos.

D. Secuencias peptídicas líder

Los polipéptidos recombinantes divulgados en el presente documento típicamente comprenden una secuencia peptídica líder para favorecer la translocación del polipéptido recombinante a través de la membrana celular de un vector de expresión, tal como una célula de mamífero, tal como una célula humana. No obstante, un polipéptido recombinante puede carecer de una secuencia peptídica líder, por ejemplo, si la secuencia peptídica líder se escinde del polipéptido recombinante por escisión enzimática o química. De forma similar, los polipéptidos recombinantes producidos sintéticamente pueden carecer de una secuencia peptídica líder.

Una secuencia peptídica líder típicamente se incluye en el extremo N de un polipéptido recombinante. Preferentemente, una secuencia peptídica líder es suficiente para translocar el polipéptido recombinante fuera de la membrana de la superficie celular de una célula eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana) tras la traducción del polipéptido recombinante en la célula eucariótica, aunque otros motivos de secuencia de un polipéptido recombinante también pueden ayudar a la translocación.

Una secuencia peptídica líder ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20, que es el péptido señal del plasminógeno tisular humano. Esta secuencia bien caracterizada puede translocar polipéptidos tanto de células humanas como de otras células de mamífero.

II. Polipéptidos oligoméricos

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a un polipéptido oligomérico que comprende 2, 3, 4 o más polipéptidos (subunidades) recombinantes como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el polipéptido oligomérico es un polipéptido dimérico, es decir, un polipéptido oligomérico que comprende dos subunidades, en el que cada subunidad es un polipéptido recombinante descrito en el presente documento. El término "polipéptido" como se usa sin los modificadores "oligomérico", "dimérico" u otra referencia explícita a una forma de múltiples subunidades, se refiere a un polipéptido recombinante que puede estar presente o no en un oligómero tal como un dímero, trímero, o tetrámero.

Cada subunidad de un polipéptido oligomérico típicamente tiene la misma secuencia de aminoácidos, aunque diferentes subunidades de un polipéptido oligomérico pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos. Se puede preparar un polipéptido heterodimérico, por ejemplo, activando los tioles de cisteína de una primera subunidad con un grupo saliente (por ejemplo, con 2-2'ditio-bis-(5-nitropiridina)), reduciendo los tioles de una segunda subunidad (por ejemplo, con β-mercaptoetanol o tris(2-carboxietil)fosfina), y a continuación poniendo en contacto la primera subunidad y la segunda subunidad. De forma alternativa, las subunidades se pueden reticular aleatoriamente y a continuación purificar. Se pueden preparar polipéptidos homodiméricos usando estrategias similares. Los polipéptidos oligoméricos se pueden purificar después de la oligomerización para separar el polipéptido oligomérico deseado de las subunidades monoméricas y otras especies no deseadas.

Un polipéptido oligomérico puede ser simétrico o el polipéptido oligomérico puede carecer de simetría. Por ejemplo, un polipéptido oligomérico puede formar un patrón de enlace disulfuro "intermolecular" que da como resultado una estructura cuaternaria que carece de simetría.

Un polipéptido oligomérico se puede reticular por interacciones no covalentes o covalentes. Un ejemplo de interacción no covalente es la trimerización de un dominio de oligomerización de GCN4 o clatrina o la tetramerización de un dominio de oligomerización de p53. Un ejemplo de una interacción covalente divulgada en el presente documento es la dimerización mediada por enlace disulfuro de una región bisagra del dominio Fc de anticuerpo. Un polipéptido dimérico divulgado en el presente documento que tiene subunidades que incluyen dominios Fc de anticuerpo se puede reticular covalentemente por al menos un enlace disulfuro, típicamente 2 enlaces disulfuro (por ejemplo, para dominios Fc derivados de IgG_1 e IgG_4) o 4 enlaces disulfuro (por ejemplo, dominios Fc derivados de IgG_2), aunque el número de enlaces disulfuro no es en particular limitante. Las IgG_3 se pueden reticular, por ejemplo, con 11 enlaces disulfuro.

Se divulga en el presente documento un polipéptido dimérico que puede comprender dos subunidades, en el que cada subunidad comprende un dominio Fc de anticuerpo, y los dominios Fc de anticuerpo reticulan las dos subunidades del polipéptido dimérico.

Un polipéptido trimérico puede comprender tres subunidades, en el que cada subunidad comprende un dominio de trimerización de GCN4, y los dominios de trimerización de GCN4 reticulan no covalentemente las tres subunidades del polipéptido trimérico. Un polipéptido trimérico puede comprender tres subunidades, en el que cada subunidad comprende un dominio de trimerización de clatrina, y los dominios de trimerización de clatrina reticulan no covalentemente las tres subunidades del polipéptido trimérico.

Un polipéptido tetramérico puede comprender cuatro subunidades, en el que cada subunidad comprende un dominio de tetramerización de p53, y los dominios de tetramerización de p53 reticulan no covalentemente las cuatro subunidades del polipéptido tetramérico.

Diversos modos de realización de la invención incluyen una composición que comprende un polipéptido dimérico, en la que la composición está esencialmente libre de polipéptidos oligoméricos que no son polipéptidos diméricos. Una composición puede carecer de polipéptidos oligoméricos que no son polipéptidos diméricos.

Diversos modos de realización de la invención incluyen una composición que comprende un polipéptido trimérico, en la que la composición está esencialmente libre de polipéptidos oligoméricos que no son polipéptidos triméricos. Una composición puede carecer de polipéptidos oligoméricos que no son polipéptidos triméricos.

Diversos modos de realización de la invención incluyen una composición que comprende un polipéptido tetramérico, en la que la composición está esencialmente libre de polipéptidos oligoméricos que no son polipéptidos tetraméricos. Una composición puede carecer de polipéptidos oligoméricos que no son polipéptidos tetraméricos.

En algunos modos de realización, una composición comprende un polipéptido recombinante monomérico, en la que la composición está esencialmente libre de polipéptidos oligoméricos. Una composición puede carecer de polipéptidos oligoméricos.

III. Ácidos nucleicos, células de clonación y células de expresión

Los modos de realización descritos en el presente documento también incluyen un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular modificado (por ejemplo, SEQ ID NO: 2-5) y/o un polipéptido recombinante descrito en el presente documento. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN. El ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante descrito en el presente documento típicamente comprende un promotor que se enlaza operativamente a la secuencia de nucleótidos. Preferentemente, el promotor puede impulsar la expresión constitutiva o inducible de la secuencia de nucleótidos en una célula de expresión de interés. La secuencia de nucleótidos precisa del ácido nucleico no es en particular limitante siempre que la secuencia de nucleótidos codifique un polipéptido recombinante descrito

en el presente documento. Los codones se pueden seleccionar, por ejemplo, para que coincidan con el sesgo de codón de una célula de expresión de interés (por ejemplo, una célula de mamífero tal como una célula humana) y/o por conveniencia durante la clonación. El ADN puede ser un plásmido, por ejemplo, que puede comprender un origen de replicación (por ejemplo, para la replicación del plásmido en una célula procariota).

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a una célula que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular modificado y/o polipéptido recombinante descrito en el presente documento. La célula puede ser una célula de expresión o una célula de clonación. Los ácidos nucleicos típicamente se clonan en *E. coli,* aunque se pueden usar otras células de clonación. Si la célula es una célula de expresión, el ácido nucleico es opcionalmente un ácido nucleico de un cromosoma, es decir, en el que la secuencia de nucleótidos se integra en el cromosoma, aunque entonces el ácido nucleico puede estar presente en una célula de expresión, por ejemplo, como ADN extracromosómico.

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a una célula que comprende un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico (por ejemplo, polipéptido dimérico, trimérico o tetramérico) como se describe en el presente documento. Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a una composición que comprende células, medios de cultivo celular y un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico como se describe en el presente documento, en la que las células comprenden un ácido nucleico que codifica el polipéptido recombinante o las subunidades del polipéptido oligomérico y los medios de cultivo celular comprenden el polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico (por ejemplo, porque las células secretaron el polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico en los medios de cultivo celular). La célula es típicamente una célula de expresión. La naturaleza de la célula de expresión no es en particular limitante. Las células de expresión de mamífero pueden permitir un plegamiento favorable, modificaciones postraduccionales y/o secreción de un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico, aunque se pueden usar otras células eucariotas o procariotas como células de expresión. Las células de expresión ejemplares incluyen células CHO, HEK, BHK, NS0, Sp2/0, COS, C127, HT-1080, PER.C6, HeLa y Jurkat.

IV. Composiciones y procedimientos relacionados con ensayos

Diversos aspectos de la invención se refieren a composiciones que comprenden un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico como se describe en el presente documento, en las que el polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico se une directa o indirectamente a un soporte sólido. El término unión "directa", como se usa en el presente documento, se refiere a la conjugación directa de una molécula a un soporte sólido, por ejemplo, una interacción oro-tiol que une un tiol de cisteína tiol de un polipéptido recombinante a una superficie de oro. El término unión "indirecta", como se usa en el presente documento, incluye la unión específica de un polipéptido recombinante a otra molécula que se une directamente a un soporte sólido, por ejemplo, un polipéptido recombinante se puede unir a un anticuerpo que se une directamente a un soporte sólido, uniendo de este modo indirectamente el polipéptido recombinante al soporte sólido (véase, por ejemplo, la FIGURA 4A). El término unión "indirecta" es independiente del número de moléculas entre el polipéptido recombinante y el soporte sólido siempre que (a) cada interacción entre la cadena margarita de moléculas sea una interacción específica o covalente y (b) una molécula terminal de la cadena margarita se una directamente al soporte sólido (véase, por ejemplo, la FIGURA 4A en la que peroxidasa de rábano picante (HRP), un anticuerpo anti-FVW, FVW y un polipéptido recombinante ("GPIbα") se unen cada uno indirectamente a un soporte sólido a través de la unión directa de un anticuerpo anti-CD42b al soporte sólido).

Diversos aspectos de la invención se refieren a una composición que comprende un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico como se describe en el presente documento, en la que el polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico se une covalente o no covalentemente a un soporte sólido. El término "unido no covalentemente", como se usa en el presente documento, se refiere a una unión específica tal como entre un anticuerpo y su antígeno, un ligando y su receptor, o una enzima y su sustrato, ejemplificada, por ejemplo, por la interacción entre proteína de unión a estreptavidina y estreptavidina o un anticuerpo y su antígeno (véase, por ejemplo, la FIGURA 4A). En general, la unión específica se refiere a interacciones con una constante de disociación (Kd) de menos de aproximadamente 10 μM, tal como menos de aproximadamente 1 μM, menos de aproximadamente 100 nM o menos de aproximadamente 10 nM.

Un soporte sólido puede comprender una partícula, una microesfera, una membrana, una superficie, un chip polipeptídico, una placa de microvaloración o la fase sólida de una columna de cromatografía. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser una microesfera de látex.

Una composición puede comprender una pluralidad de microesferas o partículas, en la que cada microesfera o partícula de la pluralidad de microesferas o partículas se une directa o indirectamente a al menos un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico como se describe en el presente documento. Una composición puede comprender una pluralidad de microesferas o partículas, en la que cada microesfera o partícula de la pluralidad de microesferas o partículas se une covalente o no covalentemente a al menos un polipéptido recombinante o polipéptido oligomérico como se describe en el presente documento.

Una composición puede comprender el factor de Von Willebrand. Una composición puede comprender FVW humano, por ejemplo, en una solución o suspensión acuosa tal como sangre completa o una fracción de la misma tal como plasma sanguíneo. Una composición puede comprender un soporte sólido en la que el soporte sólido comprende una pluralidad de microesferas o partículas, y el FVW reticula las partículas o microesferas de la pluralidad de partículas o microesferas.

Una composición puede comprender plasma sanguíneo humano. Una composición puede comprender plaquetas humanas. Una composición puede comprender plasma sanguíneo humano y plaquetas humanas.

Una composición puede comprender un anticuerpo, por ejemplo, en la que el anticuerpo no es un anticuerpo humano. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un ratón, conejo, rata, hámster, cobaya, cabra, oveja, caballo, pollo o una quimera de las especies anteriores, aunque la especie de anticuerpo no es en particular limitante. Una composición puede comprender un anticuerpo anti-FVW, preferentemente un anticuerpo anti-FVW humano. Una composición puede comprender un anticuerpo marcado fluorescentemente. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-FVW humano se une directa o indirectamente a un tinte, fluoróforo o enzima.

Una composición puede comprender un tampón de pH tal como HEPES o tampón fosfato. Una composición puede comprender polivinilpirrolidona (PVP), Tween (por ejemplo, Tween 20), o Dextran-500.

Una composición puede comprender además ristocetina. Una ventaja de los polipéptidos recombinantes divulgados en el presente documento es el desarrollo de ensayos que no requieren ristocetina. En algunos modos de realización, las composiciones divulgadas en el presente documento carecen de ristocetina.

Diversos aspectos de los modos de realización se refieren a un kit que comprende una composición como se describe en el presente documento e instrucciones de uso.

Ejemplificación

Ejemplo 1. Expresión y purificación de polipéptidos recombinantes

El dominio de unión al factor de Von Willebrand (FVW) de la glucoproteína Ibα (GPIbα) que consiste en 290 aminoácidos (SEQ ID NO: 19) se clonó con un péptido líder N terminal del activador del plasminógeno tisular humano (SEQ ID NO: 20) y una marca polihistidina C terminal (SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 43, 44 o 46). Se introdujeron mutaciones de aminoácidos seleccionadas en el dominio de unión a FVW de GPIbα. Los dominios de oligomerización y los dominios de reticulación se clonaron en construcciones seleccionadas. Las construcciones se expresaron de forma transitoria o estable en células de riñón embrionario humano (HEK) o células de ovario de hámster chino (CHO). El polipéptido recombinante se purificó a partir de sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) usando una fase móvil de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que comprendía acida de sodio al 0,02 %. La pureza del polipéptido recombinante se evaluó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida TGX™ al 4-15 % (Bio-Rad, California). Las imágenes de geles que contienen polipéptido recombinante seleccionado se muestran en la FIGURA 1.

Ejemplo 2. Medición de la afinidad de unión (Kd) entre FVW y polipéptido recombinante

Las constantes de disociación (Kd) entre FVW y polipéptidos diméricos seleccionados o un control de polipéptido monomérico (G233V, M239V - noFc (SEQ ID NO: 35)) se evaluaron por anisotropía de fluorescencia. Cada polipéptido dimérico incluyó dos subunidades polipeptídicas recombinantes, comprendiendo cada una un dominio de dimerización Fc murino y un dominio extracelular modificado de GPIbα. Los polipéptidos diméricos evaluados corresponden a SEQ ID NO: 38 (△(229-240)); SEQ ID NO: 37 (WT); SEQ ID NO: 36 (A238V); SEQ ID NO: 34 (G233V, M239V); SEQ ID NO: 32 (G233V); SEQ ID NO: 33 (G233T, M239T); SEQ ID NO: 21 (G233T); SEQ ID NO: 30 (D235V); SEQ ID NO: 31 (K237V). El dominio A1 de FVW (aminoácidos 1277-1453 de FVW humano), que se une específicamente al dominio de unión a FVW de GPIbα, se conjugó al marcador fluorescente AlexaFluor™ 488 (Molecular Probes, Oregón) usando química de cisteína-tiol-maleimida. Se conjugaron polipéptidos recombinantes con partículas de rotación lenta. Se incubó una dilución en serie 2x de cada polipéptido recombinante de 5 µM a 9,75 nM durante >30 minutos con 150 nM de la especie FVW A1-AlexaFluor™ 488 a temperatura ambiente y a continuación se midió la anisotropía de fluorescencia. Los resultados se muestran en la FIGURA 2. El polipéptido recombinante que no incluyó una mutación mostró una Kd de aproximadamente 1,25 µM. Los polipéptidos recombinantes que incluyeron una de las mutaciones G233T, D235V o K237V mostraron cada uno Kd menores de 500 nM (es decir, -67 nM, -250 nM y -300 nM, respectivamente, para mutantes individuales). La afinidad de unión relativa de los mutantes G233T, D235V o K237V se confirmó por ELISA (véanse la FIGURA 4D, 4B y 4C respectivamente, y el ejemplo 3, *infra*).

Los resultados de anisotropía de fluorescencia se confirmaron por resonancia de plasmón superficial usando Biacore™ (Biacore, Suecia) (FIGURA 3). El dominio A1 de FVW se conjugó con un chip Biacore CM5. Se midieron las tasas de asociación y disociación de un polipéptido recombinante que comprende la mutación

G233T en el dominio extracelular de GPIbα, un dominio Fc murino C terminal y una marca 8-His C terminal (SEQ ID NO: 21), y la constante de disociación se calculó como -58 nM, lo que es consecuente con la medición de -67 nM obtenida por anisotropía de fluorescencia.

Ejemplo 3. El polipéptido recombinante puede detectar defectos cualitativos en la unión de FVW por ELISA

Se usaron ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para determinar que los polipéptidos recombinantes que comprenden las mutaciones G233T (SEQ ID NO: 21), D235V (SEQ ID NO: 30) y K237V (SEQ ID NO: 31) pueden detectar diferencias cualitativas en la afinidad de unión de FVW. La FIGURA 4A muestra un diagrama del ensayo ELISA. En resumen, los pocillos de una placa multipocillo se recubrieron con un anticuerpo anti-CD42b, que se une específicamente al dominio extracelular modificado de GPIbα de los polipéptidos recombinantes y se usó para reticular indirectamente los polipéptidos recombinantes a la placa multipocillo (es decir, el soporte sólido). Se añadieron diversas muestras de control, estándares y diluciones en serie de los mismos a diferentes pocillos de la placa multipocillo incluyendo muestras de plasma asociadas con la enfermedad de Von Willebrand tipo 1, tipo 2B y tipo 3, muestras de control de plasma sanguíneo humano mezclado, muestras de control de plasma sanguíneo humano conocido por no tener enfermedad de Von Willebrand, una dilución en serie 2x de un estándar de referencia de plasma humano mezclado desde ninguna dilución hasta una dilución de 16 veces, y suero sanguíneo de cabra como control negativo. Después de la incubación, los pocillos se lavaron y a continuación se pusieron en contacto con un anticuerpo anti-FVW humano de conejo policlonal, que se conjugó a peroxidasa de rábano picante. El FVW unido se cuantificó controlando la conversión de un sustrato de peroxidasa de rábano picante en producto por espectroscopia de absorción a 450 nm.

Cada uno de los polipéptidos recombinantes que comprenden las mutaciones G233T, D235V o K237V pudieron detectar los defectos en las muestras de plasma asociados con la enfermedad de Von Willebrand tipo 1, tipo 2B y tipo 3, por ejemplo, en relación con muestras de plasma normal y muestras de control (FIGURA 4B-4D). Cada uno de los polipéptidos recombinantes que comprenden las mutaciones G233T, D235V y K237V también permitió una correlación exacta entre las cinco muestras de la dilución en serie y la medición de la absorbancia. Estos resultados demuestran que los polipéptidos recombinantes descritos en el presente documento que comprenden al menos una de las mutaciones G233T, D235V y K237V se pueden usar en ensayos para detectar la enfermedad de Von Willebrand y que dichos ensayos pueden permitir la medición exacta de la concentración y/o afinidad de unión de FVW en plasma en un intervalo dinámico que abarca más de un orden de magnitud.

Referencias

[1] US 8.932.820

[2] US 8.163.496

[3] J. L. Miller, D. Cunningham, V. A. Lyle y C. N. Finch, "Mutation in the gene encoding the a chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 88, n.º Junio, pp. 4761-4765, 1991.

[4] S. D. Russell y G. J. Roth, "Pseudo-von Willebrand Disease: A Mutation in the Platelet Glycoprotein Iba Gene Associated With a Hyperactive Surface Receptor," Blood, vol. 81, n.º 7, pp. 1787-1792, 1993.

[5] A. Hamilton *et al.*, "Frequency of Platelet type versus Type 2B von Willebrand Disease An international registry-based study," Thromb. Haemost., vol. 105, pp. 501-508, 2011.

[6] S. Enayat *et al.*, "A novel D235Y mutation in the GP1BA gene enhances platelet interaction with von Willebrand factor in an Iranian family with platelettype von Willebrand disease," Thromb. Haemost., vol. 108, n.º 5, pp. 946-954, 2012.

[7] A. I. Woods *et al.*, "Identification of p.W246L As a Novel Mutation in the GP1BA Gene Responsible for Platelet-Type von Willebrand Disease," Semin. Thromb. Hemost., vol. 40, pp. 151-160, 2014.

[8] C. Lavenu-bombled, C. Guitton, A. Dupuis, M. Baas y C. Desconclois, "A novel platelet-type von Willebrand disease mutation (GP1BA p.Met255Ile) associated with type 2B ' Malmö / New York ' von Willebrand disease," Thromb. Haemost., vol. 105, n.º 3, pp. 501-8, 2016.

[9] J. Dong *et al.*, "Novel Gain-of-Function Mutations of Platelet Glycoprotein Ib α by Valine Mutagenesis in the Cys209 Cys248 Disulfide Loop," Journal, vol. 275, n.º 36, pp. 27663-70, 2000.

[10] EP 1074564 A1

[11] US 2007/274999

[12] EP 2167978

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido recombinante que se une específicamente al factor de Von Willebrand humano, que comprende un dominio extracelular modificado de la glucoproteína plaquetaria Ibα, en el que:

el polipéptido recombinante carece de un dominio transmembranario; y

el dominio extracelular modificado comprende al menos una mutación seleccionada de G233T, D235V y K237V, en relación con SEQ ID NO: 19, que comprende además un dominio de oligomerización, en el que el dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en p53, GCN4, clatrina y marca pent,

en el que el dominio extracelular modificado tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con al menos 250 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o SEQ ID NO: 5.

2. El polipéptido recombinante de la reivindicación 1, en el que el polipéptido recombinante tiene una afinidad de unión mayor por el factor de Von Willebrand de una muestra de sangre humana o muestra de plasma sanguíneo humano que un polipéptido de control que no comprende la al menos una mutación pero que es de otro modo idéntico al polipéptido recombinante.

3. El polipéptido recombinante de la reivindicación 1 o 2, en el que la Kd del polipéptido recombinante y del factor de Von Willebrand humano es menor de 1 µM, 750 nM, 500 nM, 250 nM o 100 nM.

4. El polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un dominio de reticulación, en el que el dominio de reticulación comprende uno o más de una cisteína C terminal, un dominio C terminal cargado negativamente y una proteína de unión a estreptavidina.

5. El polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una marca de afinidad seleccionada de marca polihistidina, marca Snap, marca Clip, HaloTag, SnoopTag, SpyTag, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, marca Strep, glutatión-S-transferasa, marca FLAG, marca V5, marca Myc, marca HA, marca NE, AviTag, marca calmodulina, poliglutamato, Stag, marca SBP, Softag 1, Softag 3, marca TC, marca VSV, marca Xpress, Isopeptag, proteína portadora de biotina carboxilo, marca de proteína fluorescente verde, marca Nus, marca tiorredoxina y el dominio Fc de un anticuerpo.

6. El polipéptido recombinante de la reivindicación 5, en el que la marca de afinidad es una marca polihistidina que comprende entre 6 y 8 residuos histidina.

7. El polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de aminoácidos del dominio de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 13; o SEQ ID NO: 14.

8. El polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido recombinante tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 40; o SEQ ID NO: 41.

9. Un polipéptido oligomérico, que comprende al menos dos de los polipéptidos recombinantes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Una composición que comprende el polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el polipéptido oligomérico de la reivindicación 9, y un soporte sólido, en la que el polipéptido recombinante o el polipéptido oligomérico se une covalente o no covalentemente al soporte sólido.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que el soporte sólido comprende una partícula, una microesfera, una membrana, una superficie, un chip polipeptídico, una placa de microvaloración o la fase sólida de una columna de cromatografía.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que el soporte sólido es una partícula de látex.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además el factor de Von Willebrand.

14. La composición de la reivindicación 13, en la que:

el soporte sólido comprende una pluralidad de partículas o microesferas; y

el factor de Von Willebrand reticula las partículas o microesferas de la pluralidad de partículas o microesferas.

15. Un ácido nucleico, que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el polipéptido oligomérico de la reivindicación 9; y un promotor enlazado de forma funcional a la secuencia de nucleótidos.

FIG. 1

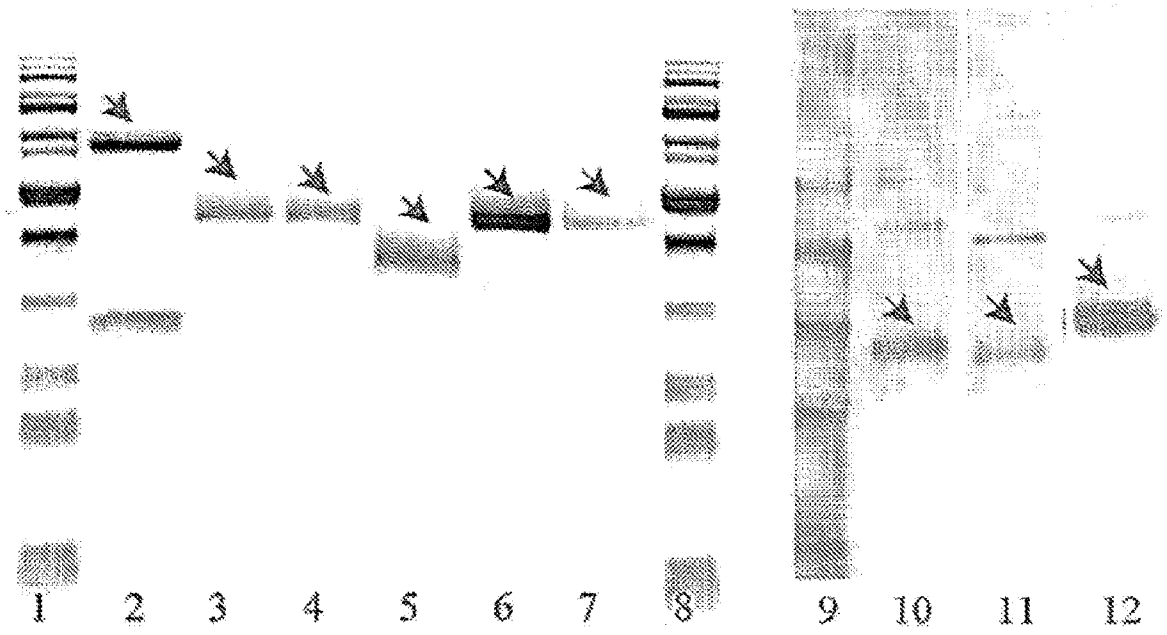

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

FIG. 2

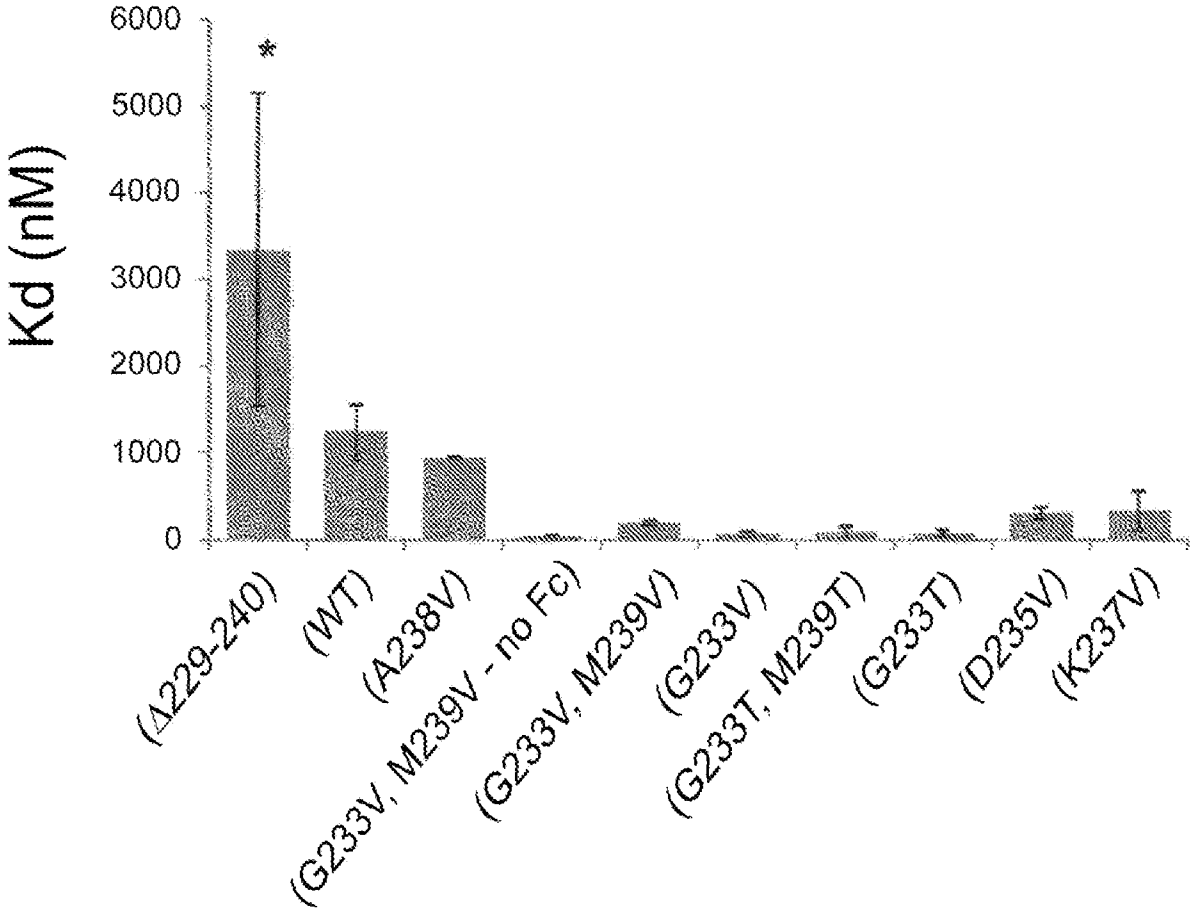

Kd (nM)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
(Δ229-240)
(WT)
(A238V)
(G233V, M239V - no Fc)
(G233V, M239V)
(G233V)
(G233T, M239T)
(G233T)
(D235V)
(K237V)

FIG. 3

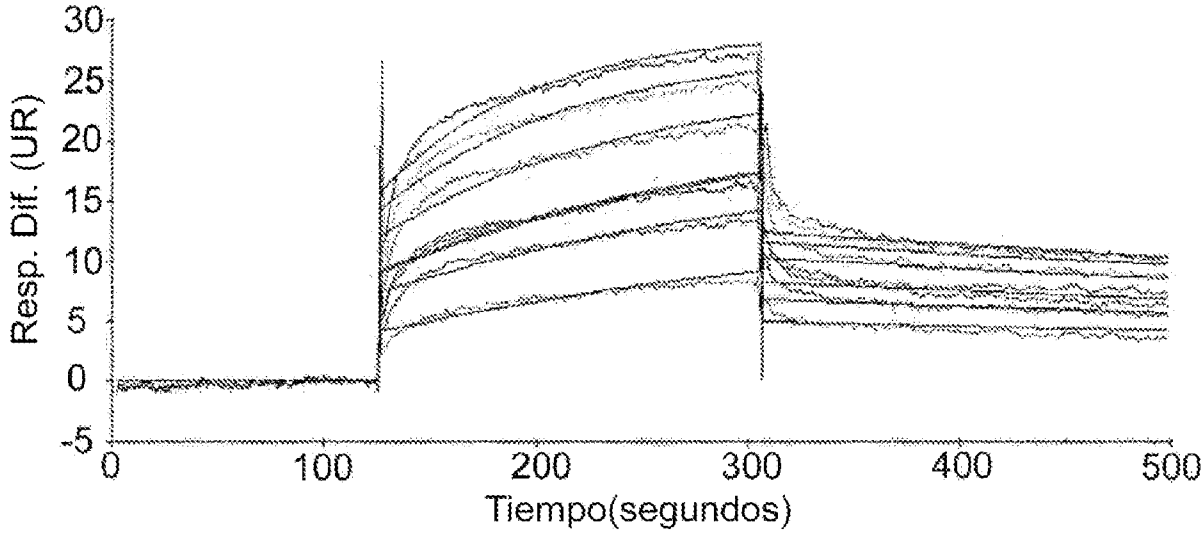

Resp. Dif. (UR)
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
100
200
300
400
500
Tiempo(segundos)

FIG. 4A

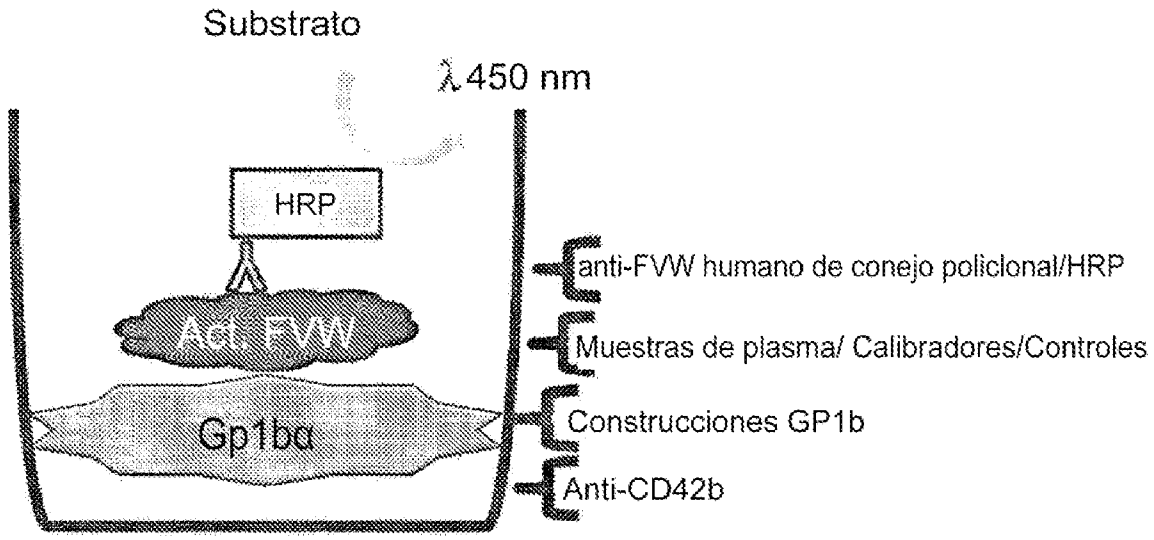
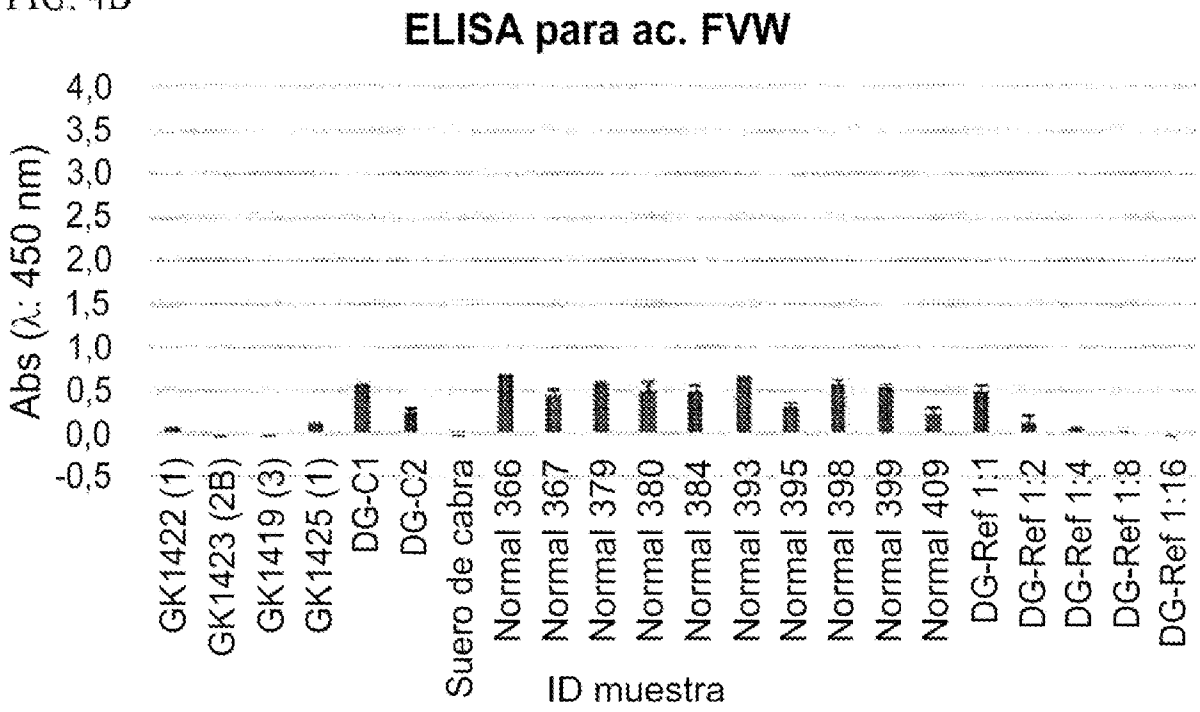
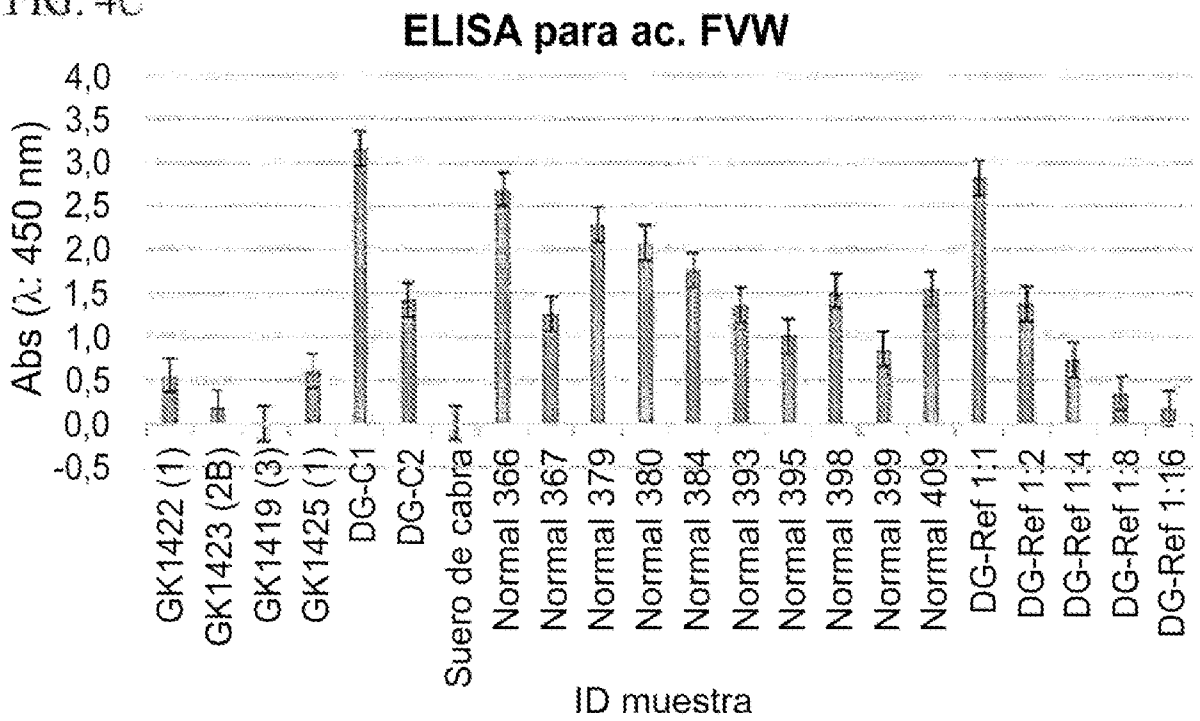

Substrato
λ450 nm
HRP
Ac. FVW
Gp1bα
anti-FVW humano de conejo policlonal/HRP
Muestras de plasma/ Calibradores/Controles
Construcciones GP1b
Anti-CD42b

FIG. 4B



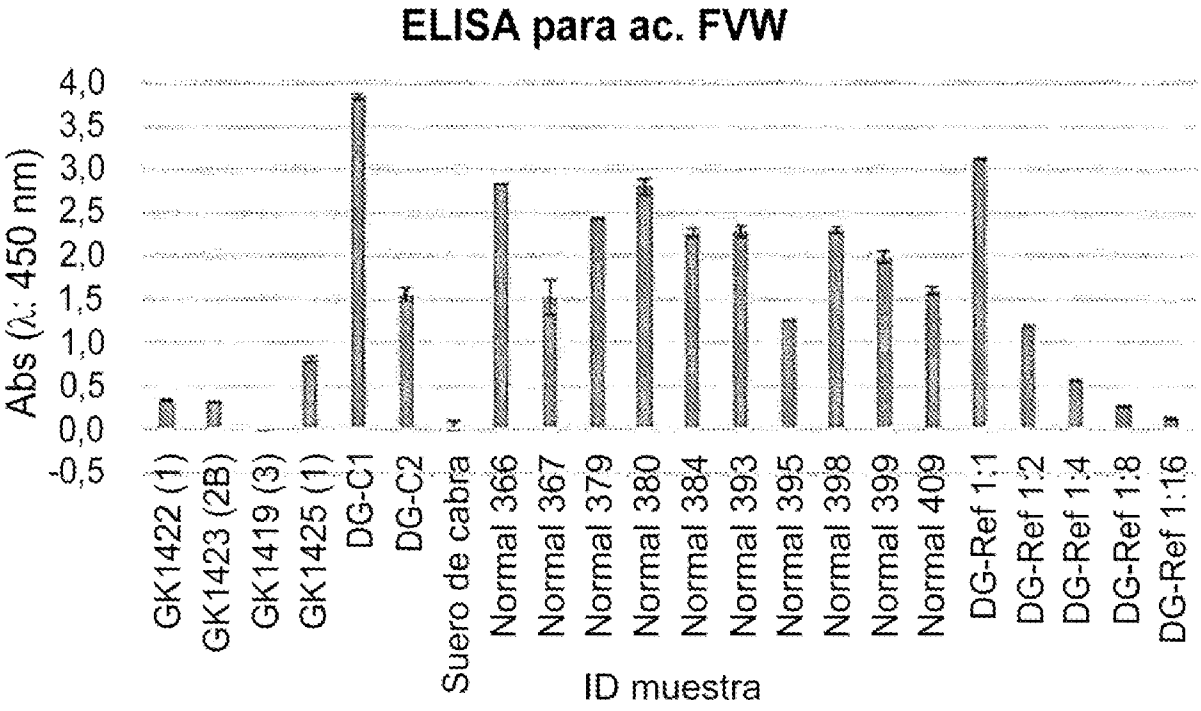
Gp1bα (C65S, D235V, Fc murino 8xHis)

FIG. 4C



Gp1bα (C65S, K237V, Fc murino 8xHis)

Fig. 4D



Gp1bα (C65S, G233T, Fc murino 8xHis)