



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 722**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/14 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06009040 .4**

96 Fecha de presentación : **03.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1705183**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Moléculas de unión para proteínas de factor humano VIII y de tipo factor VIII.**

30 Prioridad: **04.01.1999 US 224785**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2009

73 Titular/es: **Dyax Corp.**
300 Technology Square, 8th floor
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Yu, Jinan;**
Potter, Daniel M.;
Kelley, Brian D.;
Deetz, Jeffrey S. y
Booth, James E.

74 Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

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

Moléculas de unión para proteínas de factor humano VIII y de tipo de factor VIII.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del aislamiento y purificación de proteínas. En concreto, la presente invención se refiere a la identificación, aislamiento y síntesis de moléculas de unión que se adhieren a polipéptidos de factor VIII y/o de tipo factor VIII. Tales moléculas de unión son útiles para detectar y purificar los polipéptidos de factor VIII y de tipo factor VIII a partir de soluciones que los contienen.

Antecedentes

La hemofilia clásica A es el resultado de una deficiencia ligada a un cromosoma X del factor VIII de coagulación del plasma sanguíneo y afecta casi exclusivamente a los machos con una frecuencia de aproximadamente 1 caso de cada 10.000. El defecto del cromosoma X se transmite a través de los portadores hembra que no tienen la enfermedad en sí mismas. El factor VIII también se conoce como factor antihemofílico (AHF), factor hemofílico A, cofactor plaquetario, tromboplastinógeno, trombocitolisina, y globulina antihemofílica (AHG). La designación de "factor VIII:C" se utiliza para indicar que éste es el compuesto que afecta a la coagulación. El factor VIII es una proteína de peso molecular alto de 280 kDa y: está compuesto por dos cadenas de polipéptidos de 200 kDa y 80 kDa, respectivamente. Andersson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U., 83:2979-2973 (1986). Estas cadenas se mantienen juntas con un puente de ión metálico.

El principal síntoma de la hemofilia A es el sangrado sin formación de coágulos o coagulación. Antes de descubrir que la administración de concentrados de factor VIII podría aliviar los síntomas de un individuo diagnosticado con la enfermedad, la esperanza media de vida de un enfermo era de aproximadamente 20 años.

Hasta hace unos años, la fuente más importante de factor VIII con fines terapéuticos era el plasma sanguíneo normal; no obstante el factor VIII aislado mediante este método, aunque tiene algún uso, tiene algunas desventajas importantes. Por ejemplo, el factor VIII aislado de plasma sanguíneo es suficientemente impuro, teniendo normalmente una actividad específica inferior a 2 unidades de factor VIII/mg de proteína y un contenido global de factor VIII inferior a un 1%. Adicionalmente, el proceso de purificación es caro ya que la materia prima, es decir, el plasma humano, es caro. Se deben tomar también muchas precauciones para reducir el riesgo de transmitir agentes infecciosos al paciente. Por ejemplo, en sangre donada se detectan comúnmente el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y otros agentes patógenos. Otra desventaja de usar factor VIII obtenido mediante éste método es que aproximadamente una décima parte de los pacientes con hemofilia A severa desarrollan anticuerpos contra el factor VIII, haciendo difícil de tratar la enfermedad.

Los esfuerzos de la investigación se han centrado en el desarrollo de métodos para crear y aislar factor VIII biológicamente activo y altamente purificado completo y en sus formas derivadas. Las ventajas de una proteína altamente purificada incluyen niveles reducidos de proteínas extrañas en la mezcla terapéutica al igual que una menor probabilidad de presencia de agentes infecciosos. Una forma más purificada de factor VIII también se puede administrar en dosis más pequeñas, posiblemente reduciendo el riesgo de desarrollar anticuerpos anti-factor VIII, ya que dosis más bajas serían menos agresivas para el sistema inmunitario.

Se han dado pasos significativos con respecto a la producción recombinante de factor VIII empezando por el aislamiento de fragmentos de factor VIII biológicamente activos. Véase Andersson *et al.*, U.S. Pat. N° 4.749.780; Andersson *et al.*, U.S. Pat. N° 4.877.614. El gen que codifica la proteína humana completa de factor VIII se aisló para sacar provecho de su homología secuencial con el factor VIII porcino. Véase Toole *et al.*, U.S. Pat. N° 4.757.006. Toole *et al.* también informa sobre la expresión de la proteína humana y porcina que tiene actividad procoagulante de factor VIII:C.

No obstante, todavía existen efectos secundarios severos que implican la producción de anticuerpos anti-factor VIII con la administración de la proteína aislada a partir de ambas fuentes humanas y no humanas. Se sabe que los anticuerpos que reaccionan con el factor VIII:C humano también reaccionan, con un determinado alcance, con el factor VIII:C de otras especies, y el mismo factor VIII porcino es antigénico en seres humanos. Además, los no hemofílicos pueden desarrollar o adquirir la enfermedad si sus sistemas inmunológicos se hacen sensibles al factor VIII:C.

Como posible solución para este problema, se ha diseñado una proteína de peso molecular truncado e inferior que muestra actividad procoagulante. Véase Toole, U.S. Pat. N° 4.868.112. Toole proporcionó un método alternativo de tratamiento con factor VIII porcino de peso molecular inferior de aproximadamente 2000 aminoácidos exhibiendo una actividad procoagulante similar en forma de factor VIII completo. Evidentemente, la eliminación de ciertos aminoácidos y de hasta 19 de los 25 sitios de glicosilación posibles, redujo la antigenicidad de la proteína y de ese modo la probabilidad de desarrollar anticuerpos anti-factor VIII. No obstante, una dificultad con el desarrollo del factor VIII recombinante reside en alcanzar niveles de producción con rendimientos suficientemente altos.

Recientemente se han desarrollado moléculas de ADNc de factor VIII delecionadas que codifican derivados del factor VIII recombinante, las cuales pudieron ofrecer rendimientos suficientemente altos de una proteína de factor VIII

recombinante biológicamente activa para su uso en un proceso industrial para una preparación farmacéutica. Véase Almstedt *et al.*, U.S. Pat. N° 5.661.008. Almstedt *et al.* diseñó un derivado de factor VIII modificado a partir de un ADNc de factor VIII completo, el cual, al expresarse en células animales, produjo niveles altos de una proteína de tipo factor VIII con actividad de factor VIII. La proteína consistía esencialmente en dos cadenas de polipéptidos derivadas de factor VIII humano, teniendo las cadenas pesos moleculares de 90 kDa y 80 kDa, respectivamente. Según el proceso de Almstedt *et al.*, los ADNcs del factor VIII se agrupan en unidades de transcripción y se introducen en un sistema huésped adecuado para la expresión. Las líneas celulares se pueden aumentar en una gran escala en un cultivo en suspensión o en un soporte sólido. La proteína producida en el medio de cultivo se concentra y purifica entonces. La proteína activa final se compone de los aminoácidos 1 a 743 y 1638 a 2332 del factor VIII humano. Esta secuencia polipeptídica se conoce comercialmente como rFVIII-SQ o REFACTO® Véase también, Lind *et al.*, Euro. J. Biochem., 232:19-27 (1995). Otras formas de FVIII truncado también se pueden crear donde generalmente se deleta el dominio B. En tales formas de realización, los aminoácidos de la cadena pesada, los cuales consisten esencialmente en los aminoácidos 1 a 740 del factor VIII humano y tienen un peso molecular de aproximadamente 90 kD se conectan a los aminoácidos de la cadena ligera, los cuales consisten esencialmente en los aminoácidos 1649 a 2332 del factor VIII humano y tienen un peso molecular de aproximadamente 80 kD. Las cadenas pesadas y ligeras se pueden conectar mediante un péptido de enlace de entre los aminoácidos 2 y 15, por ejemplo un enlazador que comprenda residuos de lisina o arginina, o de forma alternativa, enlazar mediante un enlace de ión metálico.

Habitualmente, existe una necesidad en el campo de métodos eficientes y rentables de obtener factor VIII activo purificado directamente a partir de diversas soluciones tales como sangre o sobrenadantes de cultivo celular.

La presente invención proporciona materiales y métodos nuevos para identificar, aislar, y purificar factor VIII y proteínas de tipo factor VIII, incluyendo el REFACTO®, a partir de una solución que contiene tales proteínas, en una forma activa. Las moléculas de unión de tipo factor VIII de la presente invención muestran una afinidad alta con el factor VIII y los péptidos de tipo factor VIII. La presente invención proporciona de este modo unos medios rentables para purificar rápidamente cantidades comerciales de proteínas útiles en el tratamiento de la hemofilia A.

Resumen de la invención

Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar moléculas de unión nuevas para el factor VIII y las proteínas de tipo factor VIII. Las moléculas de unión preferidas de la presente invención muestran no sólo características diferentes a la hora de unir los polipéptidos del factor VIII objetivo sino también características específicas y deseables a la hora de liberar (elución) los polipéptidos objetivo. Las moléculas de unión especialmente preferidas según la invención son secuencias polipeptídicas cortas, caracterizadas por una estructura de bucle estable.

Se describe aquí un método preferido para aislar moléculas de unión según la invención utilizando tecnología de exposición en fago. El método de exposición en fago de la presente invención es útil para identificar familias de moléculas de unión de polipéptidos, y usando esta técnica se han identificado y aislado algunos péptidos de enlace que muestran una afinidad alta con el factor VIII y los péptidos de tipo factor VIII. Tales péptidos de unión son útiles para identificar, aislar y purificar el factor VIII y los polipéptidos de tipo factor VIII a partir de una solución.

Las moléculas de unión preferidas específicas para el factor VIII y los péptidos de tipo factor VIII aislados mediante el método de exposición en fago de la presente invención son polipéptidos caracterizados por una estructura de bucle formada como resultado de un enlace de bisulfuro entre dos residuos de cisteína localizados en las posiciones descritas en la SEC ID No: 2. Las moléculas de unión de polipéptidos específicas según la presente invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos de la siguiente fórmula general:

II. X₁₀ -X₁₁ -Cys-X₁₂ -X₁₃ -Trp-X₁₄ -X₁₅ -Pro-Cys-X₁₆ -X₁₇ (SEC ID No: 2), donde
X₁₀ es Arg o His; X₁₁ es Ala, Arg, Gly, Leu o Pro; X₁₂ es Gly o Phe; X₁₃ es Ala o Ser; X₁₄ es Leu o Phe; X₁₅ es Arg, Asn o His; X₁₆ es Ala, Asp, His, Leu, Phe, Pro, o Tyr; X₁₇ es Ala, Arg, Asn, Asp, o His.

Además, también se prevé que el método de exposición en fago de la presente invención también se pueda usar para aislar familias adicionales de moléculas de unión específicas para el factor VIII y los polipéptidos de tipo factor VIII.

Las moléculas de unión preferidas para aislar y/o purificar factor VIII y polipéptidos de tipo factor VIII, incluyendo en especial el REFATO®, mencionado anteriormente, a partir de una solución, incluyen los siguientes polipéptidos:

His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-His (SEC ID No: 10);

Arg-Gly-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-Asp (SEC ID No: 11);

ES 2 328 722 T3

	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Ala-Ala	(SEC ID No: 12);
	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Asn-Pro-Cys-Ala-His	(SEC ID No: 13);
5	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Phe-His	(SEC ID No: 14);
	His-Ala-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala	(SEC ID No: 15);
	His-Leu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala	(SEC ID No: 16);
10	His-Leu-Cys-Phe-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala	(SEC ID No: 17);
	His-Gly-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala	(SEC ID No: 18);
15	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Asn-Pro-Cys-Pro-Arg	(SEC ID No: 19);
	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Ile-Arg-Pro-Cys-Tyr-Asn	(SEC ID No: 20);
20	His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Leu-Ala	(SEC ID No: 21).

Soluciones a partir de las cuales se puede aislar y purificar factor VIII y polipéptidos de tipo factor VIII incluyen, pero no se limitan a sangre, fracciones de sangre, y sobrenadantes de cultivo celular recombinante que contienen factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII producido y segregado por la célula huésped recombinante.

También se describe un método para identificar y aislar moléculas de unión de factor VIII mediante tecnología de exposición en fago. Más específicamente, el factor VIII y las moléculas de unión de tipo factor VIII que tienen características de unión y elución específicas y predeterminadas se pueden seleccionar de una biblioteca de moléculas de unión, tal como una biblioteca de exposición en fago, mediante un método que comprende:

- (a) seleccionar una primera condición de solución (es decir, las condiciones de unión) en las cuales se desea que una molécula de unión deba exhibir una afinidad con el factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII, formando un complejo de afinidad;
- (b) seleccionar una segunda condición de solución (es decir, las condiciones de liberación) en las cuales se desea que la molécula de unión se disocie del factor VIII o del polipéptido de tipo factor VIII, donde la segunda condición de solución sea diferente en algún aspecto (p. ej., temperatura, pH, concentración de solvente, etc.) de la primera condición de solución;
- (c) Suministrar una biblioteca de análogos de un dominio de unión de factor VIII parental, donde cada análogo difiere de dicho dominio de unión parental en cuanto a la variación de la secuencia de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácidos dentro del dominio;
- (d) poner en contacto dicha biblioteca de análogos con factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII en la primera condición de solución bajo condiciones adecuadas para formar un complejo entre la molécula de unión y un factor VIII o polipéptido de tipo factor VIII;
- (e) eliminar de la solución los elementos no enlazados (análogos) de la biblioteca de dominios de unión;
- (f) someter el factor VIII o los complejos de polipéptidos de tipo factor VIII que quedan de la fase (e) a la segunda condición de solución para disociar algunos de los complejos de moléculas de unión/factor VIII (o el polipéptido de tipo factor VIII);
- (g) recuperar los análogos de unión liberados bajo la segunda condición de solución, donde los análogos recuperados identifican factor VIII aislado o moléculas de unión de tipo factor VIII.

Opcionalmente, el procedimiento anterior puede incluir fases de condición de liberación adicionales, es decir, opcionalmente sometiendo el factor VIII o los complejos de polipéptido de tipo factor VIII que quedan de la fase (f) a una tercera condición de solución para disociar otros complejos restantes, los cuales se pueden recoger en una fracción separada de las moléculas de unión de factor VIII liberadas bajo las segundas condiciones de solución. Una fase de este tipo, si las condiciones son suficientemente rigurosas para disociar todos los complejos formados en la fase (d), identificará condiciones de solución adecuadas para regenerar matrices de unión utilizando las moléculas de unión aisladas en base a este proceso.

También se describen moléculas de unión no peptídicas y polipéptidos modificados que enlazan factor VIII y/o polipéptidos de tipo factor VIII. Un ejemplo de estas modificaciones es un péptido de bucle forzado que tiene residuos de cisteína pareados los cuales forman enlaces de bisulfuro, modificado en los residuos de cisteína mediante

sustitución de una de las cisteínas por aminoácidos no naturales capaces de condensarse con la otra cadena lateral de cisteína para formar un puente de tioéter estable. Tales análogos de tioéter cíclicos de péptidos sintéticos están descritos en la publicación PCT WO 97/46251, incorporada aquí como referencia. Otras modificaciones específicamente contempladas incluyen sustituciones de aminoácidos específicas para aportar estabilidad u otras propiedades sin afectar significativamente a la unión de factor VIII, p. ej., la sustitución de Glu-Pro por Asp-Pro para reducir la labilidad del ácido); modificaciones de N-terminal o C-terminal para incorporar enlaces tales como segmentos de poli-glicina y alteraciones para incluir grupos funcionales, sobre todo funcionalidades de hidracida (-NH-NH₂), p. ej., para ayudar a la inmovilización de polipéptidos de unión según esta invención en soportes sólidos.

En otra forma de realización, la presente invención abarca una composición de materia que comprende ácidos nucleicos aislados, preferiblemente ADN, que codifica moléculas de unión de la presente invención.

También se describe un método para detectar un factor VIII o un péptido de tipo factor VIII en una solución en la que se sospecha que está contenido, que comprende poner en contacto la solución con una molécula de unión según la invención y determinar si se ha formado un complejo de unión.

Otra descripción es un método para purificar factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII a partir de una solución que lo contenga, que incluye las fases de:

- (a) poner en contacto una solución que contiene factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII con una molécula de unión según esta invención bajo condiciones de solución conductivas para formar un complejo de unión comprendido de factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII y la molécula de unión;
- (b) separar los complejos de los componentes no vinculantes de la solución;
- (c) disociar el factor VIII o el polipéptido de tipo factor VIII de la molécula de unión; (d) recoger el factor VIII purificado y disociado o el polipéptido de tipo factor VIII.

También se describe un método para aislar factor VIII y péptidos de tipo factor VIII que comprende:

- (a) inmovilizar una molécula de unión según la invención en un soporte sólido,
- (b) poner en contacto una solución que contiene factor VIII o una solución que contiene polipéptido de tipo factor VIII con el soporte sólido,
- (c) eliminar los componentes no vinculantes de la solución, y
- (d) eluir el factor VIII o el polipéptido de tipo factor VIII del soporte sólido.

Definiciones

Tal y como se usa aquí, el término “recombinante” se utiliza para describir ácidos nucleicos alterados o manipulados de forma no natural, células huéspedes modificadas con ácidos nucleicos exógenos, o polipéptidos expresados de forma no natural, mediante la manipulación de ADN aislado y la transformación de células huéspedes. Recombinante es un término que se refiere específicamente a moléculas de ADN que se han creado *in vitro* usando técnicas de ingeniería genética, y el uso del término “recombinante” como adjetivo para describir una molécula, constructo, vector, célula, polipéptido o polinucleótido excluye específicamente tales moléculas, constructos, vectores, células, polipéptidos o polinucleótidos de origen natural.

El término “bacteriófago” se define como un virus bacteriano que contiene un núcleo de ADN y una cubierta protectora desarrollada mediante la agregación de varias moléculas de proteína diferentes. Los términos “bacteriófago” y “fago” se usan aquí de forma intercambiable.

El término “polipéptido de tipo factor VIII” se utiliza para referirse a una forma modificada o troncada de factor VIII natural o factor VIII recombinante completo, cuyo polipéptido de tipo factor VIII retiene las propiedades procoagulantes del factor VIII. Ejemplos de polipéptidos de tipo factor VIII son aquellos fragmentos de factor VIII activo y derivados de factor VIII descritos en las patentes de Andersson *et al.*, Toole, y Almsted *et al.* citadas arriba, todas las cuales son incorporadas aquí como referencia. El término “factor VIII objetivo” se usa a veces más adelante para hacer referencia de forma colectiva al factor VIII y/o a los polipéptidos de tipo factor VIII contenidos en una solución o corriente de alimentación de producción.

El término “molécula de unión” según se utiliza en este caso se refiere a cualquier molécula, polipéptido, peptidomimético o célula transformada (“transformante”) capaz de formar un complejo de unión con otra molécula, polipéptido, peptidomimético o transformante. Una “molécula de unión de factor VIII” es una molécula de unión que forma un complejo con factor VIII. Ejemplos específicos de moléculas de unión de factor VIII son los polipéptidos

descritos aquí (por ej., SEC ID Nos: 1-32) y los bacteriófagos que exhiben cualquiera de estos polipéptidos. También se incluyen dentro de la definición de moléculas de unión de factor VIII los polipéptidos derivados de o que incluyen un polipéptido el cual tiene una secuencia de aminoácidos según la fórmula I, II o III, anteriores, y aquellos polipéptidos que se han modificado con fines particulares. Ejemplos específicos de modificaciones contempladas son las sustituciones de aminoácidos de C-terminal o N-terminal o los alargamientos de cadenas de polipéptidos para conectar la fracción de unión con un soporte cromatográfico u otro sustrato, y las sustituciones de parejas de residuos de cisteína que normalmente forman enlaces de bisulfuro, por ejemplo con residuos de aminoácidos de origen no natural que tienen cadenas laterales reactivas, para formar un enlace más estable entre aquellas posiciones de aminoácidos que el enlace de bisulfuro formador. Todas estas moléculas de unión modificadas también se consideran moléculas de unión según esta invención mientras que éstas retengan la capacidad de unir factor VIII y/o polipéptidos de tipo factor VIII.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La presente invención hace posible la detección altamente selectiva o la purificación de factor VIII y/o de polipéptidos de tipo factor VIII en o de soluciones que las contienen.

El factor VIII y los péptidos de tipo factor VIII se pueden producir de cualquier modo conocido, incluyendo la síntesis química; la producción en células huéspedes transformadas; la secreción en medio de cultivo mediante células de origen natural o bacterias, levaduras, hongos, células de insecto, y células mamíferas transformados por recombinación; la secreción a partir de organismos creados mediante ingeniería genética (por ej., mamíferos transgénicos); o en fluidos biológicos o tejidos tales como sangre, plasma, etc. La solución que contiene el factor VIII crudo como se ha producido inicialmente (es decir, la solución de producción) se denominará a veces "corriente de alimentación".

Todos los métodos para producir factor VIII (o un polipéptido de tipo factor VIII) dan como resultado factor VIII en una corriente de alimentación que contiene adicionalmente varias impurezas (con respecto al factor VIII). Un objetivo de la presente invención es producir ligandos de afinidad y preparaciones (tales como medios cromatográficos) que comprenden estos ligandos los cuales permiten la purificación rápida y altamente específica de factor VIII de una corriente de alimentación en particular. Los ligandos de afinidad de factor VIII obtenidos aquí se pueden confeccionar para el aislamiento de factor VIII de una corriente de alimentación en particular, bajo condiciones específicas preseleccionadas. Si se usa un método de producción alternativa para el factor VIII, produciendo una corriente de alimentación diferente, puede ser necesario una colección diferente de ligandos de afinidad para conseguir el mismo nivel de purificación. La nueva colección de ligandos se puede obtener fácilmente siguiendo los procedimientos perfilados aquí.

Las moléculas de unión de factor VIII de la invención enlazan el factor VIII con una afinidad alta, comparable a o superior a otras proteínas tales como anticuerpos conocidos por enlazar factor VIII. Además, los ligandos de afinidad preferidos descritos aquí liberan el factor VIII intacto y en forma activa bajo condiciones de liberación específicas.

Selección de las condiciones de unión y de liberación

Las moléculas de unión de polipéptidos según la presente invención se aislaron usando tecnología de exposición en fago, de forma determinada para identificar péptidos de unión de factor VIII que exhiben propiedades de unión y liberación preseleccionadas particulares. Según esta metodología, se pueden preseleccionar dos condiciones de solución, es decir, condiciones de unión y condiciones de liberación. Las condiciones de unión son un grupo de condiciones de solución bajo las cuales se desea que un polipéptido de unión descubierto enlace el factor VIII objetivo (o polipéptido de tipo factor VIII); las condiciones de liberación son un grupo de condiciones de solución bajo las cuales se desea que un polipéptido de unión descubierto no enlace el factor VIII (es decir, se disocie del factor VIII). Las dos condiciones se pueden seleccionar para satisfacer cualquier criterio del profesional, tal como la facilidad de lograr las condiciones, la compatibilidad con otras fases de purificación, costes reducidos a la hora de cambiar de condiciones en comparación con otros medios de afinidad, etc. Preferiblemente, las dos condiciones de solución se seleccionan de manera que no afecte contrariamente a la estabilidad o actividad de la proteína objetivo (factor VIII o polipéptido de tipo factor VIII) y que no difiera significativamente con respecto a al menos un parámetro de solución. Por ejemplo, a la hora de guiar la selección de los péptidos de unión adecuados descritos aquí, se seleccionaron ligantes que disociaban del objetivo en presencia de un tampón con contenido de etilenoglicol, o condiciones a pH inferior (es decir, a pH 2), o combinaciones de estas condiciones, que diferían de las condiciones empleadas para la unión. Otro parámetro que podría variarse de forma ventajosa es la concentración de una sal, por ejemplo NaCl, en los tampones de unión y elución.

Selección de un Dominio de Unión Parental

Conjuntamente con la selección de condiciones de solución específicas para la unión y liberación deseadas del factor VIII, se selecciona un dominio de unión parental para servir como molde estructural para las moléculas de unión creadas mediante ingeniería genética que muestre las capacidades de unión y liberación deseadas. El dominio de unión puede ser una proteína de origen natural o sintético, o una región o dominio de una proteína. El dominio de unión parental se puede seleccionar en base al conocimiento de una interacción conocida entre el dominio de unión parental y el factor VIII, pero éste no es crítico. De hecho, no es en absoluto esencial que el dominio de unión parental tenga alguna afinidad con el factor VIII: su objetivo es proporcionar una estructura a partir de la cual se puedan generar una pluralidad de análogos (una "biblioteca"), incluyendo esta pluralidad de análogos uno o más análogos que muestren la unión y las propiedades de liberación deseadas (y cualquier otra propiedad seleccionada). Las condiciones de unión y

las condiciones de liberación discutidas anteriormente se pueden seleccionar con conocimiento del polipéptido exacto que servirá como dominio de unión parental, o con conocimiento de una clase de proteínas o dominios a los cuales pertenece el dominio de unión parental, o de forma completamente independiente de la elección del dominio de unión parental. De forma similar, las condiciones de unión y/o de liberación se pueden seleccionar teniendo en cuenta las interacciones conocidas entre un dominio de unión y el factor VIII, por ej., para favorecer la interacción bajo una o ambas condiciones de solución, o éstas se pueden seleccionar sin tomar en consideración estas interacciones conocidas. Asimismo, el dominio de unión parental se puede seleccionar teniendo en cuenta o no las condiciones de unión y/o liberación, aunque se debe reconocer que si los análogos de dominio de unión son inestables bajo las condiciones de unión o liberación, no se pueden obtener moléculas de unión útiles.

La parte madura del dominio de unión parental influye inmensamente en las propiedades de los péptidos derivados (análogos) que se analizarán en contra de la molécula de factor VIII. A la hora de seleccionar el dominio de unión parental, la consideración más importante es cómo se presentarán los dominios análogos al factor VIII, es decir, en qué conformación entrarán en contacto el factor VIII y los análogos. En las formas de realización preferidas, por ejemplo, los análogos se generarán mediante la inserción de codificación de ADN sintético que codifica el análogo en un paquete replicable genético, dando como resultado una muestra del dominio en la superficie de un microorganismo, tal como el fago M13, usando técnicas como se describe, por ej., en Kay *et al.*, Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, (Academic Press, Inc.; San Diego 1996) y en la patente estadounidense U.S. N°. 5.123.409 (Ladner *et al.*).

Para la formación de bibliotecas de exposición en serie, se prefiere usar polipéptidos estructurados como molde de dominio de unión, en contraposición a péptidos lineales no estructurados. La mutación de residuos de superficie en una proteína tendrá normalmente poco efecto en la estructura global o las propiedades generales (tales como el tamaño, la estabilidad, y la temperatura de desnaturalización) de la proteína; aunque al mismo tiempo la mutación de residuos de superficie puede afectar profundamente a las propiedades ligantes de la proteína. Cuanto más fuertemente se constriña un segmento peptídico, menos probabilidades habrá de que se una con cualquier objetivo en particular. Si se une, no obstante, la unión será probablemente más correcta y más específica. De este modo, se prefiere seleccionar un dominio de unión parental y, sucesivamente, una estructura para los análogos de polipéptido, la cual se constriñe dentro de una estructura que tiene algún grado de rigidez.

Preferiblemente el dominio de proteína que se usa como molde o dominio parental para generar la biblioteca de análogos de dominio será una proteína pequeña o un polipéptido. Las proteínas pequeñas o los polipéptidos ofrecen varias ventajas sobre las proteínas grandes: En primer lugar, la masa por sitio de unión se reduce. Los dominios de proteína altamente estables que tienen pesos moleculares bajos, por ej., los dominios Kumitz (~7 kDa), los dominios Kazal (~7 kDa), los dominios del inhibidor de tripsina de *Cucurbita máxima* (CMTI) (~3.5 kDa), y la endotelina (~2 kDa), pueden mostrar una unión mucho mayor por gramo que los anticuerpos (150 kDa) o los anticuerpos monocatenarios (30 kDa). En segundo lugar, la posibilidad de unión no específica se reduce porque hay menos superficie disponible. En tercer lugar, las proteínas pequeñas o los polipéptidos se pueden crear mediante ingeniería genética con el fin de tener sitios de enlace únicos de una manera impracticable para las proteínas más grandes o los anticuerpos. Por ejemplo, las proteínas pequeñas se pueden crear mediante ingeniería genética con el fin de tener lisinas solamente en sitios adecuados para el enlace (por ej., en una matriz cromatográfica), pero esto no lo pueden hacer los anticuerpos. En cuarto lugar, es más posible que una estructura de polipéptido constreñida retenga su funcionalidad al transferirse junto con el dominio estructural intacto de una estructura a otra. Por ejemplo, es probable que la estructura de dominio de unión se transfiera de la estructura usada para la presentación en una biblioteca (por ej., visualizada en un fago) a una proteína aislada eliminada de la estructura de presentación o inmovilizada en un sustrato cromatográfico.

Se considera que la inmovilización de los polipéptidos según la invención, por ej., sobre matrices cromatográficas, forma medios de separación de factor VIII eficaces para soluciones tales como la sangre total o medios de cultivo acondicionados que contienen factor VIII segregado de una célula huésped transformante. Seleccionando moldes de dominio de unión apropiados, se pueden aislar los polipéptidos de unión que tienen una única cisteína libre (no transmitida con otra cisteína que normalmente forma un enlace de bisulfuro). Tales polipéptidos tio-funcionales se pueden usar para inmovilizar sustratos de forma altamente estable mediante la formación de un tioéter con yodoacetamida, ácido yodoacético, o grupos de ácido carboxílico similares al α -yodo.

De forma similar, el grupo carboxilo C-terminal del dominio de polipéptido se puede convertir en una hidracida (-NH-NH₂), para la reacción con un sustrato aldehído-funcional u otro sustrato amino-reactivo. Esta técnica se prefiere.

Hay muchos dominios de proteína pequeños y estables adecuados para su uso como dominios de unión parentales y para los cuales está disponible la siguiente información útil: (1) secuencia de aminoácidos, (2) secuencias de varios dominios homólogos, (3) estructura tridimensional, y/o (4) datos de estabilidad sobre un rango de pH, temperatura, salinidad, solvente orgánico, concentración oxidante. Algunos ejemplos son: dominios Kunitz (58 aminoácidos, 3 enlaces bisulfuro), dominios del inhibidor de tripsina de *Cucurbita máxima* (31 aminoácidos, 3 enlaces bisulfuro), dominios relacionados con la guanilina (14 aminoácidos, 2 enlaces bisulfuro), dominios relacionados con el IA de enterotoxina termoestable de bacterias gram negativas (18 aminoácidos, 3 enlaces bisulfuro), dominios EGF (50 aminoácidos, 3 bandas bisulfuro), dominios Kringle (60 aminoácidos, 3 enlaces bisulfuro), dominios de unión de carbohidrato fúngico (35 aminoácidos, 2 enlaces bisulfuro), dominios de endotelina (18 aminoácidos, 2 enlaces bisulfuro), y el dominio de unión de IgG Estreptocócico G (35 aminoácidos, ningún enlace bisulfuro). Muchos, pero no la totalidad de estos, contienen enlaces bisulfuro que mantienen y estabilizan la estructura. El dominio de unión parental

también puede basarse en un bucle único (un bisulfuro) de una microproteína homóloga o no a un dominio de proteína conocido. Por ejemplo, los bucles constreñidos de los aminoácidos del 7 al 9 se usaron para formar bibliotecas con el fin de aislar factor VIII y moléculas de unión de polipéptidos de tipo factor VIII, como se describe más adelante. Las bibliotecas basadas en estos dominios, preferiblemente visualizados en fago, se pueden construir fácilmente y usar para la selección de moléculas de unión según esta invención.

Suministro de una Biblioteca de Análogos de Dominios de Unión Parentales

Una vez se ha seleccionado un dominio de unión parental, se crea una biblioteca de moléculas de unión potenciales para seleccionar en contra de un objetivo, en este caso factor VIII y/o proteínas de tipo factor VIII, bajo las condiciones de unión deseadas y (opcionalmente) las condiciones de elución (liberación) deseadas. La biblioteca se crea haciendo una serie de análogos, correspondiendo cada análogo con el dominio de unión parental excepto por tener una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio. Se prevé que las sustituciones de aminoácidos alteren las propiedades de unión del dominio sin alterar significativamente su estructura, al menos para la mayoría de sustituciones. Se prefiere que las posiciones de aminoácidos que se seleccionan para la variación (posiciones de aminoácidos variables) sean posiciones de aminoácidos superficiales, es decir, posiciones en la secuencia de aminoácidos de los dominios que, cuando el dominio es una conformación estable en su mayor parte, aparecen en la superficie externa del dominio (es decir, la superficie expuesta a la solución). De la forma más preferible las posiciones de aminoácidos que se van a variar serán contiguas o cercanas, para maximizar el efecto de las sustituciones. Además, se pueden añadir aminoácidos extra en la estructura del dominio de unión parental. En formas de realización preferidas, especialmente donde está disponible una gran cantidad de información en lo que se refiere a las interacciones de factor VIII con otras moléculas, en particular el dominio de unión parental, las posiciones de aminoácidos esenciales para las interacciones de unión se determinarán y conservarán en el proceso de construcción de la biblioteca análoga (es decir, no se variarán los aminoácidos esenciales para la unión).

El objetivo de crear la biblioteca análoga es proporcionar un número muy grande de moléculas de unión potenciales para la reacción con la molécula de factor VIII, y en general cuanto mayor sea el número de análogos en la biblioteca, mayor será la probabilidad de que al menos un elemento de la biblioteca se enlace con el factor VIII y se libere bajo condiciones preseleccionadas o deseables para la liberación. Las bibliotecas diseñadas siguiendo una estructura de molde en particular y limitándose a la diversificación de aminoácidos en posiciones particulares son muy preferidas, puesto que una única biblioteca puede abarcar todos los análogos diseñados y las secuencias incluidas se conocerán y presentarán en números más o menos iguales. En contraste, la sustitución aleatoria en sólo seis posiciones en una secuencia de aminoácidos proporciona alrededor de 60 millones de análogos, lo cual es un tamaño de biblioteca que empieza a presentar limitaciones prácticas incluso al utilizar técnicas de selección tan fiables como la exposición en fago. Bibliotecas más grandes que ésta plantearán problemas en su manipulación, por ej., los vasos de fermentación necesitarían tener un tamaño extraordinario, y más importante aún, la probabilidad de contener todas las variaciones de secuencia polipeptídica planificadas representadas en la biblioteca preparada se reducirían enormemente. En consecuencia se prefiere crear una biblioteca diseñada o parcial, en la cual las posiciones de aminoácidos designadas para la variación estén consideradas de tal manera que maximicen el efecto de la sustitución en las características de unión del análogo, y los residuos de aminoácidos asignados o planificados para su uso en sustituciones estén limitados, por ej., basándose en que es probable que estos causen una unión del análogo bajo las condiciones de solución en las cuales se seleccionarán ligantes en la biblioteca.

Como se ha indicado previamente, las técnicas expuestas en Kay *et al.*, *supra*, y Ladner *et al.* U.S. 5.223.409 son particularmente útiles en la preparación de una biblioteca de análogos correspondiente a un dominio de unión parental seleccionado, cuyos análogos se presentarán en una forma adecuada para la selección a gran escala de grandes números de análogos con respecto a una molécula de factor VIII objetivo. El uso de paquetes genéticos replicables, y de la forma más preferible bacteriófagos, es un método fiable para generar nuevas entidades de unión de polipéptidos que implica introducir un segmento de ADN exógeno nuevo en el genoma de un bacteriófago (u otro paquete genético amplificable) de manera que el polipéptido codificado por el ADN no nativo aparece en la superficie del fago. Cuando el ADN insertado contiene diversidad de secuencia, cada fago receptor muestra una variante de la secuencia de aminoácidos del molde (parental) codificada por el ADN, y la población (biblioteca) del fago muestra un gran número de secuencias de aminoácidos diferentes pero relacionadas.

En un procedimiento de selección para obtener de factor VIII según esta invención, una biblioteca de fago se pone en contacto con y se le asigna unirse a una molécula de factor VIII objetivo, normalmente inmovilizada en un soporte sólido. Los no ligantes se separan de los ligantes. De diferentes maneras, los fagos enlazados se liberan del factor VIII, se recogen y se amplifican. Como el fago se puede amplificar a través de la infección de células bacterianas, incluso unos pocos fagos de unión son suficientes para revelar la secuencia genética que codifica una entidad de unión. Usando estas técnicas es posible recuperar un fago de unión que sea aproximadamente 1 de 20 millones en la población. Una o más bibliotecas, mostrando cada una 10-20 millones o más de polipéptidos de unión potenciales, se pueden seleccionar rápidamente para encontrar ligantes de factor VIII de alta afinidad. Cuando funciona el proceso de selección, la diversidad de la población cae con cada ronda hasta que sólo quedan ligantes buenos, es decir, el proceso converge. Normalmente, una biblioteca de exposición en fago contiene algunos ligantes estrechamente relacionados (de 10 a 50 ligantes entre 10 millones). Las indicaciones de convergencia incluyen una mayor unión (medida mediante títulos de fago) y una recuperación de secuencias estrechamente relacionadas. Después de identificar una primera serie de péptidos de unión, la información de secuencia se puede usar para diseñar otras bibliotecas parciales para elementos

que tienen propiedades deseadas adicionales; por ej., discriminación entre factor VIII y fragmentos particulares o impurezas estrechamente relacionadas en una corriente de alimentación en particular.

Tales técnicas hacen posible no sólo seleccionar un gran número de moléculas de unión potenciales sino que hacen práctico repetir los ciclos de unión/elución y construir bibliotecas parciales secundarias para seleccionar paquetes que se muestren análogos que cumplan los criterios iniciales. Usando estas técnicas, se puede seleccionar una biblioteca parcial análoga para revelar elementos que enlacen con fuerza (es decir, con afinidad alta) bajo las condiciones de selección.

Síntesis de Análogos de Polipéptido

Siguiendo los procedimientos perfilados anteriormente, se pueden aislar moléculas de unión adicionales para el factor VIII y/o los polipéptidos de tipo factor VIII de las bibliotecas de exposición en fago descritas aquí en otras bibliotecas de exposición en fago o colecciones de moléculas de unión potenciales (por ej., bibliotecas combinatorias de compuestos orgánicos, bibliotecas péptidas aleatorias, etc.). Una vez aisladas, se puede analizar la secuencia de cualquier péptido de unión individual o la estructura de cualquier molécula de unión, y se puede producir el ligante en cualquier cantidad deseada usando métodos conocidos. Por ejemplo, las moléculas de unión de polipéptidos descritas aquí, puesto que se conocen sus secuencias, se pueden producir ventajosamente mediante síntesis química seguida del tratamiento bajo condiciones oxidantes apropiadas para obtener la conformación nativa, es decir, los enlaces de uniones de bisulfuro correctos. La síntesis se puede realizar mediante metodologías bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, Kelley *et al.* en Genetic Engineering Principles and Methods, (Setlow, J.K., ed.), Plenum Press, NY., (1990) vol. 12, pp. 1-19; Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (1989), W.H. Freeman Co., San Francisco). Las moléculas de unión de la presente invención se puede obtener bien por síntesis química o por semisíntesis. La síntesis química o los métodos de semisíntesis permiten la posibilidad de incorporar residuos aminoácidos de origen no natural.

Las moléculas de unión de polipéptidos de la presente invención se preparan preferiblemente usando la síntesis péptida de fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1963); Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 5132 (1985)). La síntesis de fase sólida comienza en el carboxi-terminal del polipéptido putativo acoplando un aminoácido protegido a una resina adecuada, la cual reacciona con el grupo carboxi del aminoácido C-terminal para formar un enlace que se dividirá fácilmente más tarde, tal como una resina de halometilo, p. ej., resina de clorometilo y resina de bromometilo, resina de hidroximetilo, resina de aminometilo, resina de benzhidrilamina, o resina de t-alquiloxycarbamil-hidracida. Después de eliminar el grupo de protección de α -amino con, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno y neutralizarlo en, por ejemplo, TEA, está todo preparado para proceder con el siguiente ciclo en la síntesis. El α -amino restante y, si es necesario, los aminoácidos protegidos de la cadena lateral, se acoplan entonces en secuencia en el orden deseado mediante condensación para obtener un compuesto intermedio conectado a la resina. De forma alternativa, algunos aminoácidos se puede acoplar a otro formando un oligopéptido antes de añadir el oligopéptido a la cadena de polipéptido de fase sólida en crecimiento.

La condensación entre dos aminoácidos, o un aminoácido y un péptido, o un péptido y un péptido se puede llevar a cabo según los métodos de condensación usuales tales como el método de azida, el método de anhídrido de ácido mezclado, el método de DCC (diciclohexilcarbodiimida), el método de éster activo (método de éster de p-nitrofenilo, el método de BOP [hexafluorofosfato de fosfonio de benzotriazol-1-il-oxi-tris (dimetilamino)], el método de éster de imido de ácido N-hidroxisuccínico), y el método K reactivo de Woodward.

Es común en la síntesis química de péptidos la protección de los grupos reactivos de cadenas laterales de las diferentes fracciones de aminoácidos con grupos de protección adecuados en el sitio hasta que el grupo se elimine en última instancia después de haberse unido la cadena completamente. También es común la protección del grupo de α -amino en un aminoácido o un fragmento mientras que esta entidad reacciona en el grupo carboxilo seguido de la eliminación selectiva del grupo α -amino protector para permitir a una reacción posterior tener lugar en esta ubicación. Por consiguiente, es común que, como una de las fases en la síntesis, se produzca un compuesto intermedio que incluya cada uno de los residuos de aminoácidos localizados en la secuencia deseada en la cadena de polipéptidos con varios de estos residuos que tienen grupos de protección de cadena lateral. Normalmente estos grupos de protección se eliminan después de forma sustancial al mismo tiempo para producir el producto deseado resultante de la siguiente purificación.

Los grupos protectores típicos para proteger los grupos de cadena lateral de α - y ϵ -amino se ejemplifican mediante benciloxycarbonilo (Z), isonicotiniloxycarbonilo (iNOC), O-clorobenziloxycarbonilo [Z(NO₂)], p- metoxibenziloxycarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amioxicarbonilo (Aoc), isobomiloxycarbonilo, adamatiloxycarbonilo, 2-(4-bifenilo)-2-prapiloxycarbonilo (Bpoc), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), metilsulfoniitboxycarbonilo (Msc), trifluoroadetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofeailsulfenilo (NPS), difenilfosfinotioilo (Ppt), dimetilofosfinotioilo (Mpt), y similares.

Como grupos protectores para el grupo carboxi se pueden ejemplificar, por ejemplo, el éster de bencilo (OBzl), el éster de ciclohexilo (Chx), el éster de 4-nitrobenzilo (ONb), el éster de t-butilo (Obut), el éster de 4 piridilmetilo (OPic), y similares. Es deseable que aminoácidos específicos tales como arginina, cisteína, y serina que poseen un grupo funcional diferente de los grupos amino y carboxilo se protejan mediante un grupo protector adecuado según

requiera la ocasión. Por ejemplo, el grupo de guanidino en arginina se puede proteger con nitro, p-toluenesulfonilo, benciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p- metoxibencenosulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbenzenosulfonilo (Mds), 1,3,5-trimetilfenisulfonilo (Mts), y similares. El grupo de tiol en cisteína se puede proteger con p-metoxibenzilo, trifetilmetilo, etilcarbamoilo de acetilaminometilo, 4-metilbenzilo, 2,4,6-trimetilbenzilo (Tmb), etc., y el grupo hidroxilo en la serina se puede proteger con bencilo, t- butilo, acetilo, tetrahidropiraniolo, etc.

Después de haberse completado la secuencia de aminoácidos deseada, el polipéptido intermedio se elimina del soporte de resina mediante un tratamiento con un reactivo, tal como líquido HF y uno o más destructores que contengan tio, los cuales no sólo separan el polipéptido de la resina, sino que también separan todos los grupos protectores de cadena lateral restantes. Tras la ruptura de HF, se lava la secuencia de proteínas con éter, se transfiere a un volumen grande de ácido acético diluido, y se agita a un pH ajustado a aproximadamente 8.0 con hidróxido amónico. En el ajuste de pH, el polipéptido toma su disposición conformacional deseada.

Los polipéptidos según la invención también los pueden preparar a nivel comercial compañías que proporcionen síntesis de polipéptidos como servicio (por ej., BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA).

Uso de las Moléculas de Unión en la Detección o la Purificación

Para detectar factor VIII y/o polipéptidos de tipo factor VIII en una solución tal como sangre o medios acondicionados donde se crea que los contengan, se puede marcar una molécula de unión según la invención de forma detectable, por ej., por radiomarcación o marcación enzimática, después ponerla en contacto con la solución, y después de eso se puede detectar la formación de un complejo entre la molécula de unión y el factor VIII objetivo. Una molécula de unión de fago según la invención, es decir, un fago recombinante que muestra un polipéptido ligante de factor VIII en su superficie, puede formar un complejo con factor VIII y/o polipéptidos de tipo factor VIII detectable como un sedimento en un tubo de reacción, el cual se puede detectar visualmente después de precipitarse o centrifugarse.

De forma alternativa, se puede usar un ensayo de tipo sándwich, donde se inmoviliza una molécula de unión de factor VIII en un soporte sólido tal como un tubo de plástico o un pocillo, o una matriz cromatográfica tal como perlas de sefarosa, después se pone en contacto la solución que se cree contiene el factor VIII objetivo con la molécula de unión inmovilizada, se lavan y se retiran los materiales no vinculantes, y se detecta el factor VIII o los polipéptidos de tipo factor VIII del complejo usando un reactivo de detección adecuado, tal como un anticuerpo monoclonal, reconociendo el factor VIII objetivo, siendo detectable el reactivo mediante algunos medios convencionales conocidos en la técnica, incluyendo marcarlos de forma detectable, por ej., por radiomarcado o marcado enzimático, como por ejemplo con peroxidasa de rábano y similares.

Las moléculas de unión según esta invención serán extremadamente útiles para aislar el factor VIII y/o los polipéptidos de tipo factor VIII mediante métodos de cromatografía de afinidad. Se puede emplear cualquier método convencional de cromatografía. Preferiblemente, se inmovilizará un ligando de afinidad de la invención en un soporte sólido adecuado, por ej., para embalar una columna de cromatografía. El ligando de afinidad inmovilizado se puede cargar o poner en contacto entonces con una corriente de alimentación bajo condiciones favorables para la formación de la molécula de unión/complejos de factor VIII (o polipéptido de tipo factor VIII). Los materiales no vinculantes se pueden lavar y retirar, después se puede eluir el factor VIII (o polipéptido de tipo factor VIII) introduciendo condiciones de solución que favorezcan la disociación del complejo de unión.

De forma alternativa, la cromatografía por lotes se puede llevar a cabo mezclando una solución que contiene el factor VIII objetivo y la molécula de unión, y después aislando complejos del factor VIII objetivo y de las moléculas de unión. Para este tipo de separación, se conocen muchos métodos. Por ejemplo, se puede inmovilizar la molécula de unión en un soporte sólido, y después separarla de la corriente de alimentación con el factor VIII objetivo mediante filtración. O se puede modificar la molécula de unión con su propia marca de afinidad, tal como una cola de poliHis, la cual se puede usar para enlazar el ligante después de que los complejos se hayan formado usando una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Una vez separado, el factor VIII objetivo se puede liberar de la molécula de unión bajo condiciones de elución y recuperarlo en forma pura.

Se debe observar que aunque se preseleccionaron condiciones de unión precisas a la hora de obtener los polipéptidos de unión de factor VIII descritos aquí, el uso posterior en la purificación de afinidad puede revelar una unión más óptima y condiciones de liberación bajo las cuales operará el mismo ligando de afinidad aislado. De este modo, no es fundamental que la molécula de unión, después del aislamiento según esta invención, se emplee siempre solamente en las condiciones de unión y de liberación que llevan a su separación de la biblioteca.

El aislamiento de moléculas de unión de factor VIII conforme a esta invención se ilustrará adicionalmente más adelante. Los parámetros específicos incluidos en los siguientes ejemplos se destinan a ilustrar la práctica de la invención, y de ninguna manera se presentan con el fin de limitar el alcance de la invención.

Ejemplo I

El Aislamiento de Moléculas de Unión para un Polipéptido de tipo Factor VIII

Las técnicas anteriormente descritas se emplearon para aislar moléculas de unión de afinidad alta para ligandos para polipéptidos de tipo factor VIII producidos de forma recombinante que consisten en dos segmentos de factor VIII humano, es decir, los aminoácidos 1- 743 y 1638 a 2332 del factor VIII humano, como se describe en la patente estadounidense U.S. N°. 5.661.008 (Almstedt *et al.*), obtenidos según la designación comercial de REFACTO® del Genetics Institute, Inc. (Cambridge, MA). El REFACTO® objeto se proporcionó en una concentración de aproximadamente 530 µg/ml (7800 IU/ml) en 19.4 mM de His, 300 mM de NaCl, 3.4 mM de CaCl₂ y 0.1% de Tween 80, a pH 7.0.

Tres bibliotecas, designadas TN7 (5 x 10⁹ de diversidad de secuencia de aminoácidos), TN8 (6 x 10⁹ de diversidad de secuencia de aminoácidos), y TN9 (5 x 10⁹ de diversidad de secuencia de aminoácidos), se construyeron para la expresión de polipéptidos diversificados en el fago M13. Se seleccionaron los ligantes de cada biblioteca para el REFACTO® purificado. Cada una de las bibliotecas se construyó para exponer una microproteína basada en un molde de 11 o 12 aminoácidos. La biblioteca TN7 utilizó una secuencia de molde de Xaa- Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEC ID No: 33); la biblioteca TN8 utilizó una secuencia de molde de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEC ID No: 34); la biblioteca TN9 utilizó una secuencia de molde de Xaa-Cys- Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa (SEC ID No: 35).

Para cada biblioteca se realizaron tres ciclos de selección. En la conclusión de la tercera ronda de selección se propagaron los fagos eluidos, y cada uno de los aislados de cada biblioteca (96 por condición de elución) se seleccionaron aleatoriamente y evaluaron mediante técnicas ELISA estándar para la unión al factor VIII objetivo. Los fagos unidos se detectaron con el anticuerpo policlonal anti-M13 conjugado con HRP (Pharmacia). El sustrato de peroxidasa TMB se usó para el HRP en el mecanismo de detección ELISA. El sustrato de TMB produce un color azul después de la digestión de peroxidasa. El color se cuantifica mediante absorbencia en OD₆₃₀. Los aislados de fago que proporcionaron una señal significativa (OD₆₃₀ > 0.25) de los antecedentes anteriores se consideraron clones positivos. Se realizó la secuenciación del ADN de estos aislados para identificar el péptido visualizado.

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos visualizados se dedujeron de las secuencias de ADN obtenidas. Los datos de secuencia de los aislados de fago fueron reagrupados por la biblioteca y clasificados según el grado de similitud. La frecuencia en la cual se obtuvo cualquier secuencia dada se anotó ya que ésta indica la selección de un ligante específico. Los aislados de fago que tienen el mismo péptido de visualización se encontraron presentes en las poblaciones de fago obtenidas mediante ambos métodos de elución.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión objetivo de la biblioteca TN7

TN7 aislado	secuencia	frecuencia (elución)	señal ELISA	SEC ID NO:
A06	His-Ser-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Phe- Pro-Cys- Phe-Ala	7/96 (EG)	0.5	4
A08	Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro- Cys-Pro- Phe	2/96 (EG)	0.4	5
D03	Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu Phe Pro- Cys-Ser- Leu	7/192 (EG/pH2)	0.2	6
D04	Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys- Ser-Ala	6/192 (EG/pH2)	0.3	7
A09	Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys- Leu-His	2/192 (EG/pH2)	0.1	8
C5/G10	Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro- Cys-Ser-Ala	1/96 (EG)	0.5	9

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión objetivo de la biblioteca TN8

TN8 aislado	secuencia	frecuencia (elución)	señal ELISA	SEC ID NO:
C10	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro- Cys-Leu- His	10/192 (EG/pH2)	1.0	10
B05	Arg-Gly-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg- Pro-Cys-Leu- Asp	2/192 (EG/pH2)	0.2	11
E04	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro- Cys-Ala- Ala	3/192 (EG/pH2)	0.3	12
F02	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Asn- Pro-Cys-Ala- His	5/192 (EG/pH2)	0.3	13
A02	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg- Pro-Cys-Phe- His	3/96 (EG)	0.7	14
H07	His-Ala-Gys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg- Pro-Cys-His- Ala	3/192	0.4	15
E02	His-Lcu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg- Pro-Cys-Asp- Ala	61/192 (EG/pH2)	0.4	16
C12	His-Leu-Cys-Phe-Ala-Trp-Phe-Arg- Pro-Cys- Asp-Ala	1/96 (EG)	0.4	17
A01	His-Gly-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro- Gys-His- Ala	4/192 (EC/pH2)	0.2	18
E01	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Asn- Pro-Cys-Pro- Arg	1/96 (pH2)	0.2	19
H08	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Leu-Arg-Pro- Cys-Tyr- Asn	1/96 (EG)	1.0	20
A11/G 10	His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro- Cys-Leu- Ala	1/96 (EG)	0.3	21

ES 2 328 722 T3

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión de objetivo de la biblioteca TN9

TN9 aislado	secuencia	frecuencia (elución)	señal ELISA	SEC ID NO:
B04	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp- His-Cys-His	6/192 (EG/pH2)	0.8	22
G02	Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala- His-Cys-Leu	2/96 (EG)	0.2	23
B01	Phe-Cys-His-Val-Phe-His-Phe-Ser- His-Cys-Asp	5/192 (EG/pH2)	0.2	24
A01	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp- His-Cys-His	12/192 (EG/pH2)	1.2	25
E03	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Asn-Phe-Ser- His-Cys-Ser	4/192 (EG/pH2)	1.1	26
C02	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn- His-Cys- Asp	5/96 (pH2)	0.4	27
E12	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn- His-Cys-Ser	6/96 (EG)	1.0	28
E09	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Gln- His-Cys-Ala	4/192 (EG/pH2)	1.1	29
D06	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-His- His-Cys-Phe	2/192 (EG/pH2)	0.3	30
C01	Phe-Cys-His-Val-Phe-Asn-Phe-Val- His-Cys-Ser	2/192 (EG/pH2)	0.5	31
H11	Phe-Cys-His-Val-Phe-Pro-Phe-Leu- His-Cys- Asp	2/192 (EG/pH2)	0.2	32

Ejemplo II

Preparación de Ligandos de Afinidad para un Factor VIII Objetivo

- 5 En base a los datos presentados anteriormente, se seleccionaron y sintetizaron nueve péptidos para su inmovilización en un material matricial de afinidad. Los péptidos sintetizados se exponen en la Tabla 4.

TABLA 4

Secuencia de Aminoácidos de Ligandos de Afinidad y sus Densidades en Soporte Sólido			
Ligando de Afinidad	Aislado de Fago	Secuencia (bucle bisulfuro subrayado)	Densidad de Ligando mg/ml (μmol/ml)
CS-453	C10-TN8	AEGTGDHPCG <u>SWLRPCL</u> HDPGPEGGS-NHNH ₂	2.64 (0.98)
CS-454	E02-TN8	AEGTGDHLCGAWFRPCDADPGPEGGS-NHNH ₂	1.79 (0.67)
CS-455	A09-TN7	AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGS-NHNH ₂	2.21 (0.83)
CS-456	A08-TN7	AEGTGDFGC <u>SWLFPC</u> PFDPGPEGGS-NHNH ₂	3.69 (1.43)
CS-458	B04-TN9	AEGTGDPCCWVFAFDHCHDPGPEGGS-NHNH ₂	3.15 (1.17)
CS-459	E09-TN9	AEGTGDFCWWFPFOHCADPGPEGGS-NHNH ₂	2.72 (1.02)
CS-460	D06-TN9	AEGTGDFCWWFPFHHCDFDPGPEGGS-NHNH ₂	4.24 (1.54)
GI-1	C05/G10-TN7	Acetyl-AEGTGDRLC <u>SWVSPC</u> SADPEGGSK	0.83 (0.32)
GI-2	A11/G10-TN8	Acetyl-AEGTGDHRCG <u>SWLHPCL</u> ADPEGGSK	0.43 (0.16)

Los péptidos de afinidad de la Tabla 4 se identifican, en el orden de arriba, con las SEC ID Nos: 36-44.

- Los nueve péptidos de afinidad ejemplificados se produjeron mediante métodos sintéticos de fase sólida tradicionales como se ha descrito anteriormente. Para facilitar la inmovilización en un soporte sólido, se incorporó una región enlazadora corta funcional de siete aminoácidos de hidracida (-PGPEGGS-NHNH₂; SEC ID No: 45) en el carboxi-terminal de siete de los péptidos (véase la Tabla 4). Se usó un enlazador de inmovilización alternativo con dos de los péptidos (GI-1 y GI-2 en la Tabla 4), es decir, -PEGGSK; (SEC ID No: 46), exponiendo un C-terminal de lysine para la inmovilización y un amino-término acetilado.

Los ligandos candidatos se inmovilizaron sobre una resina cromatográfica de etilenoglicol-metacilato sustituido con formilo (Toyopearl Formyl 650-M, tamaño de poro de $\sim 1000\text{\AA}$; TosoHaas, Montgomeryville, PA). Los péptidos que contienen hidracida se inmovilizaron facilitando la formación de enlace de hidrazono, los péptidos GI-1 y -2 se inmovilizaron mediante aminación reductiva usando NaCNBH_3 . La cantidad de polipéptidos inmovilizados en el soporte sólido se determinó cuantificando la cantidad de polipéptidos libres restante en la solución. La cantidad de ligandos inmovilizados por ml de resina estuvo en el rango de 0.7-1.5 μmol para los péptidos inmovilizados de hidracina.

Los nueve péptidos se evaluaron mediante cromatografía de afinidad por su capacidad para capturar el REFACTO® descrito en el Ejemplo I, bajo un enlace específico y condiciones de liberación. Los tampones usados en estas evaluaciones se exponen en la Tabla 5.

TABLA 5

Condiciones de Unión y Elución Empleadas	
Tampón de unión	100mM de NH_4OAc , pH 6.3, 0.8M de NaCl, 1M de Sorbitol, 0.02% de Tween 80, 3mM de EDTA, 5mM de CaCl_2
Tampón de elución	A al 50% etilenoglicol, 20mM de His, 0.25M de NaCl, 20mM de CaCl_2 , 0.01% de Tween 80, pH 7
Tampón de elución B	0.35M de CaCl_2 , 20mM de His, 0.3M de NaCl, 0.1% de Tween 80, a pH 7
pH 2 limpio	100mM de Gly, 1M de NaCl, pH 2

El polipéptido enlazante de factor VIII (REFACTO®) se diluyó en el Tampón SP en una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$. Las resinas de afinidad ($\sim 350\text{ }\mu\text{l}$) se embalaron cada una en columnas de vidrio, y aproximadamente 150 μg del factor VIII objetivo se aplicó a las columnas de afinidad preparadas a una velocidad de flujo de 200 $\mu\text{l/minuto}$ (velocidad lineal de 170 cm/hora). El material unido se eluyó consecutivamente con los tampones tal y como se muestra en la Tabla 5, y la elución de proteínas se supervisó mediante absorbencia UV a 280 nm. Las fracciones se recogieron y la masa y la actividad del polipéptido de tipo factor VIII recuperado se determinó mediante HPLC de fase inversa y mediante ensayo enzimático.

Para la determinación de la masa, se generó una curva estándar con REFACTO® (0-200 μg) y la cantidad presente en cada fracción se calculó según técnicas bien conocidas en la materia. Se usó HPLC de fase inversa en presencia de 20 mM de EDTA para disgregar la molécula de REFACTO® en sus subunidades de componente, las cuales se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo/0.01% de TFA. El ensayo de actividad fue un ensayo basado en los Factores IX y X. Los resultados para cada resina de afinidad se exponen abajo (Tabla 6).

TABLA 6

Resumen de Datos Obtenidos con Nueve Ligandos de Afinidad						
		Condición de Elución (% de recuperación)				
Péptido	Ensayo	Flujo	A	B	pH2	Total
Resina	RP-HPLC	64.4	2.8	0	0	67.2
No tratada	Actividad	64.4	0.6			65.0
CS-453	RP-HPLC	0	43.2	0	0	43.2
	Actividad	0	26.4			26.4
CS-454	RP-HPLC	25	45.1	0	0	47.6
	Actividad	2.2	42.4			44.6
CS-455	RP-HPLC	65.8	1.4	0	0	67.2
	Actividad	61.6	1.3			62.9
CS-456	RP-HPLC	3.4	44.8	0	0	48.2
	Actividad	4.8	43.0			47.8
CS-458	RP-HPLC	1.8	54.3	0	0	56.1
	Actividad	1.4	55.6			57.0
CS-459	RP-HPLC	1.6	42.1	0	0	43.7
	Actividad	6.4	31.2			37.6
CS-460	RP-HPLC	24.6	28.8	0	0	53.4
	Actividad	28.4	0			28.4
GI-1	RP-HPLC	65.7	0	0	0	65.7
	Actividad	64.0	0			64.0
GI-2	RP-HPLC	31.3	28.1	0	2.0	61.4
	Actividad	33.7	20.3			53.9

En general, la cantidad total de factor VIII objetivo recuperado después de la cromatografía sobre los nueve ligandos estuvo en el rango de 40-67%. Los ligandos de polipéptidos CS-453; CS-454; CS-456, y CS-459 capturaron prácticamente todo el factor VIII objetivo aplicado, con material ligante eluido en presencia de etilenoglicol. No se encontró actividad en el eluyente de pH 2, en consecuencia se asumió que ninguno de los objetivos restantes se unió al ligando. La incapacidad de las resinas CS-455 y GI- 1 de capturar el objetivo se puede deber a la degradación o inestabilidad del péptido o a la baja densidad del ligando en el soporte.

Ejemplo III

Unión Comparativa de nhfVIII y REFACTO®

5 Los experimentos se llevaron a cabo con el fin de demostrar que los ligandos de polipéptido inmovilizados del Ejemplo II enlazan y liberan factor VIII humano nativo (nhfVIII) bajo condiciones similares y con rendimientos similares a los observados con el polipéptido de tipo factor VIII REFACTO®.

10 Para estos experimentos, el nhfVIII se obtuvo del American Diagnostica, Inc. (Greenwich, CT; product #408 nat) en forma de un polvo liofilizado con agentes estabilizantes. El nhfVIII se reconstruyó según las instrucciones del fabricante en un tampón reconstituyente (72 mM de NH₄ OAc, a pH 6.3, 360 mM de NaCl, 0.04% de Tween 80 (Tampón 1).

15 Un kit comercial ELISA (IMUBIM) fVIII ELISA kit, Product #884, American, Inc., (Greenwich, CT) desarrollado para detectar factor VIII se usó según las especificaciones del fabricante con el fin de detectar los objetivos tanto del REFACTO® como de nhfVIII. El kit utiliza un ensayo de sándwich ELISA en el cual el objetivo se captura con un anticuerpo monoclonal inmovilizado y el objetivo capturado se detecta con un segundo conjugado de peroxidasa monoclonal de anticuerpo de rábano (HRP). La adición del sustrato de peroxidasa y su reacción posterior con el HRP produce un color azul (detectado a 630 nm) que cambia a amarillo (detectado a 450 nm) al añadir los 0.5N de solución de parada de ácido sulfúrico. La respuesta de color se calibra con estándares de factor VIII proporcionados por el fabricante.

20 La unión de REFACTO® se evaluó en el Tampón 1. La unión de ambos REFACTO® y nhfVIII se evaluó usando tres resinas de afinidad preparadas como en el Ejemplo II, usando los péptidos de afinidad CS-454, CS-456, y CS-458 inmovilizados en un medio de Toyopearl Formil 650-M. La densidad de ligando para cada polipéptido fue de 1.79 mg/ml (0.67 µmol/ml), 3.69 mg/ml (1.43 µmol/ml) y 3.15 mg/ml (1.17 µmol/ml) respectivamente.

30 Para cada uno de los tres péptidos inmovilizados evaluados, las perlas de péptido de 200 ml de una pasta al 50% de una suspensión de polipéptido acoplado con Toyopcarl se centrifugaron brevemente (30 segundos a 2000 x g a temperatura ambiente), el fluido sobrenadante se eliminó, y las perlas (granulados) se lavaron dos veces. En cada lavado, las perlas se resuspendieron en 500 µl del Tampón 1 y se centrifugaron como antes.

35 La solución madre de REFACTO® se diluyó a una concentración final de 200 U/ml en el Tampón 1 y se añadieron 250 µl de la solución diluida (~50 U total) a un granulado lavado de cada una de las perlas de péptido. La suspensión se incubó en un mezclador extremo-sobre-extremo a RT durante una hora, después de este periodo de unión se granularon las perlas mediante centrifugado (30 segundos, 2000 x g) y las soluciones sobrenadantes, que representaban la fracción no unida ("No unido" en la Tabla 7, abajo), se apartaron y retuvieron para un ensayo de actividad de factor VIII no enlazado.

40 Las perlas granuladas se lavaron una vez añadiendo 250 µl del Tampón 1, se mezclaron brevemente y la suspensión se centrifugó como antes. Las soluciones sobrenadantes ("Lavado" en la Tabla 7) se eliminaron y retuvieron para un ensayo de actividad de factor VIII.

45 Los granulados lavados se resuspendieron en 250 µl del Tampón A (20 mM de L-Histidina-HCl, 250 mM de NaCl, 20 mM de CaCl₂, 0.01% de Tween 80, 50% de etilenoglicol, pH 6.3) y se incubaron en un mezclador extremo-sobre-extremo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al final del periodo de elución, las suspensiones se centrifugaron como se describe arriba. Las soluciones sobrenadantes ("Eluato" en la tabla 7) se eliminaron y retuvieron para un ensayo de actividad de factor VIII eluido.

50 La solución inicial (diluida) de REFACTO® (Insumo) y cada muestra (No unido, Lavado y Eluato) tomada como se ha descrito anteriormente se diluyeron a 1:1400 en Diluyente de Ensayo (proporcionado en el kit), después se sometieron a ELISA usando el kit de ensayo comercial de factor VIII. La Tabla 7 resume los resultados.

TABLA 7

Unión y Elución por Lotes de REFACTO® con Ligandos de Polipéptido Inmovilizados					
Ligando de Péptido Inmovilizado	% de insumo recuperado en:				
	Insumo	No enlazado	Lavado	Eluato	Total
CS-454	100	24	12	49	85
CS-456	100	47	20	24	91
CS-458	100	20	10	47	76

ES 2 328 722 T3

Para cada polipéptido inmovilizado evaluado, casi todo el REFACTO® (> 75%) añadido a la reacción de unión se recuperó en las fracciones de No enlazado, Lavado, y Eluato. Una pequeña cantidad de material (10%-25%) puede haber quedado retenida en las perlas después de la elución.

Después se regeneraron las perlas de afinidad mediante un lavado en etilenglicol al 50%, 20 mM de His, 0.25M de NaCl, 20 mM de CaCl₂, 0.01% de Tween 80, pH 7, y dos lavados con 250 µl de 30 mM H₃PO₄, 1M de NaCl, pH 2 (15 minutos para cada lavado). Tras los lavados a pH 2, se lavaron las perlas una vez en PBS con un 0.05% de azida y se almacenaron a 4°C.

Una muestra de nhfVII se diluyó a una concentración final de 100 U/ml mediante la adición de 2.32 ml de H₂O, 180 µl de 1M NH₄OAc, pH 6.3 (a 72 mM), y 1 µl de Tween 80 (al 0.04%). La solución madre REFACTO® se diluyó a 100 U/ml en un Tampón 1 modificado, en el cual la concentración de NaC se redujo de 660 mM a 330 mM.

Se evaluó la unión de los péptidos inmovilizados con nhfVIII en comparación con REFACTO®. Como control no vinculante, un polipéptido de la biblioteca TN9 (B10), el cual se enlaza a un objetivo no relacionado y no se enlaza con un factor VIII objetivo, se inmovilizó en las mismas perlas de metacrilato, como se ha descrito anteriormente. Después, el nhfVIII y las soluciones de REFACTO® se mezclaron con perlas de afinidad regeneradas que llevaban los ligandos CS-454, CS-456, y CS-458 en un procedimiento comparativo de purificación en lotes. Las condiciones de reacción se exponen en la Tabla 8.

TABLA 8

Condiciones de Reacción para el Ensayo de Unión con nhfVIII

Ligando de Péptido Inmovilizado	Volumen de Pasta de Perlas (µl)	Objetivo (100 U/ml)	Volumen de Reacción (µl)
CS-454	200	nhfVIII	500
CS-456	200	nhfVIII	500
CS-458	200	nhfVIII	500
TN9-B10	200	nhfVIII	500
CS-458	100	REFACTO®	250
TN9-B10	100	REFACTO®	250

Los resultados de estos procesos se exponen en la Tabla 9.

Unión y Elución por Lotes de nhfVIII y REFACTO® con Ligandos de Polipéptido Inmovilizados

Ligando de Péptido Inmovilizado	Objetivo	% del Total Recuperado en:		
		No unido	Lavado	Eluato
CS-454	nhfVIII	67	12	21
CS-456	nhfVIII	70	14	16
CS-458	nhfVIII	48	13	39
TN9-B10	nhfVIII	86	14	0
CS-458	REFACTO®	59	14	27
TN9-B10	REFACTO®	90	10	0

En conclusión, los ligandos de polipéptido inmovilizados, CS-458, CS-454, y CS-456 enlazan y liberan nbfVIII bajo condiciones similares y con rendimientos similares según se observó previamente con un polipéptido de tipo factor VIII.

Después de la descripción precedente, se pueden apreciar las características importantes para las moléculas de unión de afinidad que permiten detectar o separar factor VIII o polipéptidos de tipo factor VIII en o de cualquier solución. Serán evidentes formas de realización de moléculas de unión adicionales de la invención y métodos alternativos adaptados a una solución particular o corriente de alimentación tras estudiar la descripción precedente. Todas estas formas de realización y alternativas obvias están destinadas a estar dentro del campo de esta invención, tal y como se define por las reivindicaciones que siguen.

Documentos citados en la descripción

Esta lista de documentos citados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4749780 A, Andersson [0006]
- US 4877614 A, Andersson [0006]
- US 4757006 A, Toole [0006]
- US 4868112 A, Toole [0008]
- US 5661008 A, Almstedt [0009] [0060]
- WO 9746251 A [0020]
- US 5123409 A, Ladner [0035]
- US 5223409 A, Ladner [0043]
- US 0000043 W, 2000 [0088]
- US 09224785 B, 1999 [0088]

Literatura no patente citada en la descripción

- **Andersson** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, vol. 83, 2979-2973 [0002]
- **Lind** *et al.* *Euro. J. Biochem.*, 1995, vol. 232, 19-27 [0009]
- **Kay** *et al.* *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Academic Press, Inc.* 1996. [0035]
- **Kelley** *et al.* *Genetic Engineering Principles and Methods Plenum Press* 1990. vol. 12, 1-19 [0046]
- **Stewart** *et al.* *Solid-Phase Peptide Synthesis W.H. Freeman Co.* 1989. [0046]
- **Merrifield** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149- [0047]
- **Houghten** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 5132- [0047]

REIVINDICACIONES

5 1. Polipéptido que une factor VIII y/o un polipéptido de tipo factor VIII que tiene una secuencia de aminoácidos la cual incluye la siguiente secuencia:

10 X10-X11-Cys-X12-X13-Trp-X14-X15-Pro-Cys-X16-X17 (SEC ID No: 2), donde X10 es Arg o His; X11 es Ala, Arg, Gly, Leu o Pro; X12 es Gly o Phe; X13 es Ala o Ser; X14 es Leu o Phe; X15 es Arg, Asn o His; X16 es Ala, Asp, His, Leu, Phe, Pro o Tyr; X17 es Ala, Arg, Asn, Asp o His.

15 2. Polipéptido según la reivindicación 1, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

20 His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Leu-Ala;
His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-His;
Arg-Gly-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-Asp;
25 His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Ala-Ala;
His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Asn-Pro-Cys-Ala-His;
His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Phe-His;
30 His-Ala-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala;
His-Leu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala;
His-Leu-Cys-Phe-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala;
35 His-Gly-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala;
His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Asn-Pro-Cys-Pro-Arg;
40 His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Tyr-Asn.

3. Polipéptido según la reivindicación 1, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

45 AEGTGDHPCGSWLRPCLHDPGPEGGGGS-NH₂;
AEGTGDHLCGAWFRPCDADPGPEGGGGS-NH₂;
50 Acetil-AEGTGDRLCVSPCSADPGEGGGSK; y
Acetil-AEGTGDHRCGSWLHPCLADPGEGGGSK.

55 4. Polipéptido según la reivindicación 1, donde el polipéptido es capaz de unir factor VIII humano y/o un polipéptido de tipo factor VIII en una solución que comprende 100 mM de NH₄OAC, 0.8M de NaCl, 1M de Sorbitol, 0.02% de Tween 80, 3 mM de EDTA, 5 mM de CaCl₂ a pH 6.3 y de disociar de dicho factor VIII humano y/o polipéptido de tipo factor VIII una solución que contiene un 50% de etilenglicol.

60 5. Polipéptido según la reivindicación 4, que disocia de dicho factor VIII y/o del polipéptido de tipo factor VIII al ponerse en contacto con una solución que comprende un 50% de etilenglicol, 20 mM de His, 0.25 M de NaCl, 20 mM de CaCl₂, 0.01% de Tween 80, a pH 7.

6. Polipéptido según la reivindicación 4, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

65 His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Leu-Ala;
His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-His;

Arg-G ly-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-Asp;

His-Prc-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Ala-Ala;

5 His-Prc-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Asn-Pro-Cys-Ala-His;

His-Prc-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Phe-His;

10 His-Ala-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala;

His-Leu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala;

His-Leu-Cys-Phe-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala;

15 His-Gly-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala; y

His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Tyr-Asn.

20 7. Polipéptido según la reivindicación 6, donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

AEGTGDHPCGSWLRPCLHDPGPEGGS-NH₂;

25 AEGTGDHLCGAWFRPCDADPGPEGGS-NH₂; y

Acetil-AEGTGDHRCGSWLHPCLADPGEGGSK.

30 8. Método para detectar factor VIII humano y/o un polipéptido de tipo factor VIII en una solución en la que se sospecha que esté contenido comprendiendo:

- (a) poner en contacto tal solución con un polipéptido según cualquiera de los de las reivindicaciones 1-7, y
- (b) determinar si la unión ha tenido lugar entre dicho polipéptido y dicho factor VIII humano y/o polipéptido de tipo factor VIII.

35

9. Método para purificar factor VIII humano y/o polipéptidos de tipo factor VIII que comprende:

- (a) inmovilizar una molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un soporte sólido;
- (b) poner en contacto una solución que contenga factor VIII humano y/o polipéptidos de tipo factor VIII con dicho soporte; y, después,
- (c) separar la solución de dicho soporte.

45

10. Bacteriófago recombinante aislado el cual expresa ADN exógeno que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde dicho polipéptido se muestra en la superficie de dicho bacteriófago.

50 11. Método para detectar factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII en una muestra, el cual comprende poner en contacto dicha muestra con un bacteriófago según la reivindicación 10 y detectar si la unión ha tenido lugar entre dicho bacteriófago y factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII.

12. Medios de separación que comprenden:

55

- (a) un material matricial poroso cromatográfico, e, inmovilizado sobre el mismo,
- (b) un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

60

13. Medios de separación que comprenden el producto de reacción de:

- (a) un material matricial amino-reactivo cromatográfico, y
- (b) un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

65

ES 2 328 722 T3

14. Medios de separación según la reivindicación 13, donde dicho material matricial es una resina cromatográfica de metacrilato aldehído-funcional.

5 15. Medios de separación según la reivindicación 14, donde dicha resina es un soporte de copolímero de etileno-glicol-metacrilato sustituido con formilo.

16. Método para separar factor VIII o un polipéptido de tipo factor VIII de una solución que lo contenga que comprende:

- 10 (a) poner en contacto dicha solución con medios de separación tal y como se define en la reivindicación 12 bajo condiciones de unión,
- (b) eliminar el material no unido, y
- 15 (c) eluir el factor VIII unido o los polipéptidos de tipo factor VIII de dichos medios de separación.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 722 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Potter, M. Daniel
Yu, Jinan
5 Kelley, Brian D
Deetz, Jeffrey S
Booth, James E

<120> Moléculas de Unión para Factor VIII Humano y Proteínas de Tipo Factor VIII
10 <130> DYX-008.0 PCT

<140> PCT/US00/00043
15 <141> 2000-01-03

<150> 09/224,785
20 <151> 1999-01-04

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.1
25 <210> 1
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> (1)..(2)
<223> xaa1 es Arg, Phe, His o Pro; xaa2 es Ser, Gly, Leu o His

<220>
45 <221> VARIANTE
<222> (4)..(8)
<223> Xaa3 es Gly, Asn, Ile o Ser; Xaa4 es Ser, Trp o Gly; Xaa5 es Trp, Ile, Leu o Val; Xaa6 es Phe, Trp o Ser; Xaa7
es Pro o Phe
50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(11)
55 <223> Xaa8 es Ser, Leu, Pro o Phe; Xaa9 es Ala, Phe, Leu o His

<400> 1
60 **Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa**
1 5 10

<210> 2
65 <211> 12
<212> PRT

ES 2 328 722 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (1)..(2)

<223> Xaa1 es Arg o His; Xaa2 es Ala, Arg, Gly, Leu o Pro

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa4 es Gly o Phe; Xaa5 es Ala o Ser

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(8)

25 <223> Xaa7 es Leu o Phe; Xaa8 es Arg, Asn o His

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> (11)..(12)

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

<400> 2

35 **Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Pro Cys Xaa Xaa**

1 5 10

<210> 3

40 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<220>

50 <221> VARIANTE

<222> (3)

<223> Xaa3 es His o Trp

55 <220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(6)

60 <223> Xaa5 es His o Phe; Xaa6 es Ala, Asn, His o Pro

<220>

<221> VARIANTE

65 <222> (8)

<223> Xaa8 es Ala, Asn, Asp, Gln, His, Leu, Ser o Val

ES 2 328 722 T3

 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANTE

$$\langle 222 \rangle \quad (11)$$

⁵ <223> Xaa11 es Ala, Asp, His, Leu, Phe o Ser

 $\langle 400 \rangle$ 3

Phe **Cys** **Xaa** **Val** **Xaa** **Xaa** **Phe** **Xaa** **His** **Cys** **Xaa**

<210> 4

15 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 4

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

<210> 5

30 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

40 $\langle 400 \rangle$ 5

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

45 $\langle 210 \rangle$ 6

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

55
<400> 6

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

<210> 7

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 328 722 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

5 <400> 7

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

10 <210> 8

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

20 <400> 8

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

25 <210> 9

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 9

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

<210> 10

<211> 12

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 10

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

<210> 11

60 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

ES 2 328 722 T3

<400> 11

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

5

<210> 12

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 12

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

20

<210> 13

<211> 12

25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 13

35

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

40

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

45

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

50

<400> 14

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

55

<210> 15

<211> 12

60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

ES 2 328 722 T3

<400> 15

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

<210> 16

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

¹⁵ <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 16

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

<210> 17

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 17

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

<210> 18

40 $\langle 211 \rangle$ 12.

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 18

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

<210> 19

<211> 12

<212> RRT

<213> Secuencia Artificial

60

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

65

ES 2 328 722 T3

<400> 19

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

 $\langle 210 \rangle$ 20

<211> 12

10 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

 $\langle 400 \rangle$ 20

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

 $\langle 210 \rangle$ 21

25 $\langle 210 \rangle$ 21
 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial. Péptido de Bucle de Unión Sintética

35 <400> 21

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

40 $\langle 210 \rangle$ 22

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

50
<400> 22

<400> 22

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

<210> 23

 $\langle 211 \rangle$ 11

60 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

ES 2 328 722 T3

<400> 23

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

<210> 24

 $\langle 211 \rangle$ 11

10 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

 $\langle 400 \rangle$ 24

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

<210> 25

25 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 25

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

40 $\langle 210 \rangle$ 26

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

50 <400> 26

<400> 26

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

<210> 27

 $\langle 211 \rangle$ 1160 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

ES 2 328 722 T3

<400> 27

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

<210> 28

 $\langle 211 \rangle$ 1110 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

¹⁵ <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 28

20 Phe Cys Trp val Phe Pro Phe Asn His Cys Ser
1 5 10

25 $\langle 210 \rangle$ 29

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

35 <400> 29

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

 $\langle 210 \rangle$ 30

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

⁵⁰ <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

 $\langle 400 \rangle$ 30

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

<210> 31

<211> 11

00 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 31

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

<210> 32

10 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de Bucle de Unión Sintética

<400> 32

20
Phe Cys His Val Phe Pro Phe Leu His Cys Asp
1 5 10

25 $\langle 210 \rangle$ 33

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: molde para el péptido de bucle de unión sintética

35 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANTE

 $\langle 222 \rangle$ (1)..(11)

40 <223> las posiciones de aminoácido 3 y 9 no varían en Cys; todas las demás posiciones Xaa son variadas menos Cys, para proporcionar una biblioteca de 5x10(9) péptidos diferentes basados en la secuencia del molde

<400> 33

45
Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10

<210> 34

50 $\langle 210 \rangle$ 34
 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: molde para péptido de bucle de unión sintético

60 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANTE

<222> (1)..(12)

65 <223> las posiciones de aminoácido 3 y 10 no varían en Cys; todas las demás posiciones Xaa son variadas menos Cys, para proporcionar una biblioteca de 6x10(9) péptidos diferentes basados en la secuencia del molde

ES 2 328 722 T3

<400> 34

5 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10

<210> 35

 $\langle 211 \rangle$ 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

¹⁵ <223> Descripción de Secuencia Artificial: molde para péptido de bucle de unión sintético

 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANTE

20 $\langle 222 \rangle$ (1)..(11)

<223> las posiciones de aminoácido 2 y 10 no varían en Cys; todas las demás posiciones xaa son variadas menos Cys, para proporcionar una biblioteca de 5x10(9) péptidos diferentes basados en la secuencia del molde

25 <400> 35

Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10

30

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético

40

<400> 36

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

45

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

<210> 37

50 $\langle 211 \rangle$ 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético

<400> 37

60

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

65

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

<210> 38

ES 2 328 722 T3

<211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético
 10 <400> 38
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe His Cys Ile Gly Val Trp Phe Cys Leu
 1 5 10 15
 15 His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 39
 20 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético
 <400> 39
 30 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Gly Cys Ser Trp Leu Phe Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Phe Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 20 25
 35 <210> 40
 <211> 26
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético
 <400> 40
 50 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Cys Trp Val Phe Ala Phe Asp His Cys
 1 5 10 15
 His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 20 25
 55 <210> 41
 <211> 26
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético

ES 2 328 722 T3

<400> 41

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

Ala Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Ser
20 25

10 $\langle 210 \rangle$ 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: factor sintético VIII afinidad ligando

20

<400> 42

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

39 <210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético

40 <400> 43

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Arg Leu Cys Ser Trp Val Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
45 Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
20 25

<210> 44

50 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ligando de afinidad de Factor VIII sintético

<400> 44

60

Ala Glu Gly Thr Gly Asp His Arg Cys Gly Ser Trp Leu His Pro Cys
1 5 10 15
Leu Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
20 25

<210> 45

ES 2 328 722 T3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: enlazador de inmovilización sintética para el C-terminal peptídico

10 <400> 45

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 46

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: enlazador de inmovilización sintética para el C-terminal peptídico

25

<400> 46

Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
1 5

30

35

40

45

50

55

60

65