(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 499 040**

(51) Int. CI.:

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 7/54 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2000 E 10182747 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2301953**

(54) Título: **Moléculas de unión para las proteínas similares al factor VIII y factor VIII humano**

(30) Prioridad:

04.01.1999 US 224785

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2014

(73) Titular/es:

DYAX CORP. (100.0%)
55 Network Drive
Burlington, MA 01803, US

(72) Inventor/es:

YU, JINAN;
POTTER, DANIEL M.;
KELLEY, BRIAN D.;
DEETZ, JEFFREY S. y
BOOTH, JAMES E.

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

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 las proteínas similares al factor VIII y factor VIII humano

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo del aislamiento y purificación de proteínas. Específicamente, la presente invención se refiere a la identificación, aislamiento y síntesis de moléculas de unión que se unen a polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII. Tales moléculas de unión son útiles para la detección y purificación de polipéptidos similares al factor VIII y factor VIII a partir de soluciones que los contienen.

ANTECEDENTES

La hemofilia clásica A es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X del factor de coagulación VIII de plasma sanguíneo y afecta casi exclusivamente a varones con una frecuencia de aproximadamente 1 caso por cada 10,000. El defecto del cromosoma X se transmite por los portadores femeninos que no tienen la enfermedad. El Factor VIII también se conoce como factor antihemofílico (AHF), factor hemofílico A, cofactor de plaquetas, tromboplastinogeno, trombocitolisina, y globulina antihemofílica (AHG). La designación "factor VIII: C" se utiliza para indicar que es el compuesto que afecta a la coagulación. Factor VIII es una proteína de alto peso molecular de 280 kDa y se compone de dos cadenas de polipéptido de 200 kDa y 80 kDa, respectivamente. Andersson y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:2979-2973 (1986). Estas cadenas se mantiene juntas por un puente de ion metálico.

El síntoma principal de la hemofilia A es el sangrado sin formación de coágulos o coagulación. Antes del descubrimiento de que la administración de concentrados de factor VIII pueden aliviar los síntomas de una persona diagnosticada con la enfermedad, la esperanza media de vida de un paciente era de unos 20 años.

Hasta hace pocos años, la principal fuente de factor VIII con fines terapéuticos fue el plasma sanguíneo normal; sin embargo el factor VIII aislado por este método, aunque de alguna utilidad, tiene varias desventajas importantes. Por ejemplo, el factor VIII aislado de plasma sanguíneo es bastante impuro, típicamente tiene una actividad específica de menos de 2 unidades de factor VIII / mg de proteína y un contenido total de factor VIII de menos de 1%. Además, el proceso de purificación es caro porque el material de partida, es decir, plasma humano, es caro. También deben tomarse muchas precauciones para disminuir el riesgo de transmisión de agentes infecciosos al paciente. por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y otros agentes causantes de enfermedades se detectan comúnmente en la sangre donada. Otra desventaja del uso de factor VIII obtenido por este método es que aproximadamente una décima parte de los pacientes con hemofilia grave desarrollan anticuerpos contra el factor VIII, haciendo la enfermedad difícil de tratar.

Los esfuerzos de investigación se han centrado en el desarrollo de métodos para crear y aislar altamente purificado, factor VIII biológicamente activo de longitud completa y formas derivadas. Las ventajas de una proteína altamente purificada incluyen los niveles de proteínas extrañas reducidos en la mezcla terapéutica, así como una disminución de la probabilidad de la presencia de agentes infecciosos. Una forma más purificada de factor VIII también puede administrarse en dosis más pequeñas, posiblemente reduciendo el riesgo de desarrollar anticuerpos anti-factor VIII, como dosis más bajas serían menos estimulantes para el sistema inmune.

Pasos significativos se han tomado hacia la producción recombinante de factor VIII que comienza con el aislamiento de fragmentos de factor VIII biológicamente activos. Ver, Andersson y otros, patente de los EE.UU. núm. 4,749,780; Andersson y otros, patente de los EE.UU. núm. 4,877,614. El gen que codifica la proteína del factor VIII humano de longitud completa se aisló aprovechando su homología de secuencia con el factor VIII porcino. Ver, Toole y otros, patente de los EE.UU. núm. 4,757,006. Toole y otros, también informan de la expresión de la proteína humana y porcina que tiene actividad factor VIII:C procoagulante.

Sin embargo, todavía existen graves efectos secundarios que implican la producción de anticuerpos anti-factor VIII con la administración de la proteína aislada de ambas fuentes humanas y no humanas. Los anticuerpos que reaccionan con el factor VIII:C humano también son conocidos por reaccionar, en cierta medida, con el factor VIII:C de otras especies, y el factor VIII porcino en sí es antigénico en seres humanos. Además, los no hemofílicos pueden desarrollar o adquirir la enfermedad, cuando sus sistemas inmunes se sensibilizan al factor VIII:C.

Como una posible solución a este problema, ha sido diseñada una proteína truncada, de menor peso molecular que presenta actividad procoagulante. Ver, Toole, patente de los EE.UU. núm. 4,868,112. Toole informó de un método alternativo de tratamiento con el factor VIII porcino de menor peso molecular de aproximadamente 2000 aminoácidos que

muestra actividad procoagulante similar al factor VIII de longitud completa. Evidentemente, la eliminación de ciertos aminoácidos y hasta 19 de los 25 posibles sitios de glicosilación, reduce la antigenicidad de la proteína y por lo tanto la probabilidad de desarrollar anticuerpos anti-factor VIII. Sin embargo, una dificultad con el desarrollo del factor VIII recombinante está alcanzando niveles de producción con rendimientos suficientemente altos.

Recientemente, se han desarrollado moléculas de ADNc de factor VIII suprimido que codifican para derivados de factor VIII recombinantes, que podían dar rendimientos suficientemente altos de una proteína recombinante de factor VIII biológicamente activo para su uso en un proceso industrial para una preparación farmacéutica. Ver, Almstedt y otros., U.S. Pat. No. 5,661,008. Almstedt y otros, diseñaron un factor VIII modificado derivado de un ADNc de un factor VIII de longitud completa, que, cuando se expresa en células animales, produce altos niveles de una proteína similar al factor VIII con la actividad del factor VIII. La proteína consistió esencialmente de dos cadenas de polipéptidos derivados del factor VIII humano, las cadenas con pesos moleculares de 90 kDa y 80 kDa, respectivamente. De acuerdo con el proceso de Almstedt y otros, los ADNc de factor VIII se ensamblan en unidades de transcripción y se introducen en un sistema huésped adecuado para la expresión. Las líneas celulares se pueden cultivar a gran escala en cultivo en suspensión o sobre un soporte sólido. La proteína producida en el medio de cultivo entonces se concentra y se purifica. La proteína activa final se compone de los aminoácidos 1 a 743 y 1638 a través de 2332 de factor VIII humano Esta secuencia polipeptídica se conoce comercialmente como rFVIII-SQ o REFACTO®. Véase también, Lind y otros., Euro. J. Biochem., 232:19-27 (1995).Otras formas de FVIII truncado pueden construirse además en las que se elimina generalmente el dominio B. En tales realizaciones, los aminoácidos de la cadena pesada, que consiste esencialmente de los aminoácidos 1 a 740 de Factor VIII humano y tienen un peso molecular de aproximadamente 90 kD se conectan a los aminoácidos de la cadena ligera, que consiste esencialmente en los aminoácidos 1649 a 2332 del Factor VIII humano y que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kD. Las cadenas pesadas y ligeras pueden estar conectados por un péptido enlazador de 2 a 15 aminoácidos, por ejemplo un enlazador que comprende residuos de lisina o arginina, o alternativamente, unidas por un enlace de iones metálicos.

Actualmente, hay una necesidad en el campo de métodos eficientes y rentables para la obtención del factor VIII activo purificado directamente de varias soluciones, tales como sangre o sobrenadantes de cultivo de células.

La presente invención proporciona nuevos materiales y métodos para identificar, aislar, y purificar el proteínas similares al factor VIII y factor VIII, incluyendo REFACTO®, partir de una solución que contiene tales proteínas, en una forma activa. Las moléculas de unión de factor VIII de la presente invención exhiben una alta afinidad para el péptidos similares al factor VIII y factor VIII. Por tanto la presente invención proporciona un medio rentable para la purificación rápida de cantidades comerciales de proteínas útiles en el tratamiento de la hemofilia A.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevas moléculas de unión para el proteínas similares al factor VIII y factor VIII. Las moléculas de unión preferidas de la presente invención exhiben no sólo las características distintivas para la unión de los polipéptidos de factor VIII diana, sino también las características específicas y deseables para la liberación (elución) de los polipéptidos diana. Las moléculas de unión especialmente preferidas de acuerdo con la invención son secuencias de polipéptidos cortos, caracterizadas por una estructura de bucle estable,

Un método preferido se describe en el presente documento para el aislamiento de moléculas de unión según la invención mediante el empleo de la tecnología de exhibición de fagos. El método de exhibición de fagos de la presente invención es útil para identificar familias de moléculas de unión de polipéptidos, y usando de esta técnica se han identificado y aislado varios péptido de unión que exhiben alta afinidad para el péptidos similares al factor VIII y factor VIII. Tales péptidos de unión son útiles para identificar, aislar y purificar el polipéptidos similares al factor VIII y factor VIII a partir de una solución.

Las moléculas de unión más preferidas específicas para el péptidos similares al factor VIII y factor VIII aislados por el método de exhibición de fagos de la presente invención son polipéptidos caracterizados por una estructura de bucle formado como resultado de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína localizados en las posiciones descritas en sec. con núm. de ident.: 1 Moléculas de unión de polipéptidos específicos incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos de la siguiente fórmula general:

I. X_1-X_2-Cys-X_3-X_4-X_5-X_6X_7-Cys-X_8-X_9 (sec. con núm. de ident.: 1),

en donde X_1 es Arg, Phe, His o Pro; X_2 es Ser, Gly, Leu o His; X_3 es Gly, Asn, Ile o Ser; X_4 es Ser, Trp o Gly; X_5 es Trp, Ile, Leu o Val; X_6 es Phe, Trp o Ser; X_7 es Pro o Phe; X_8 es Ser, Leu, Pro o Phe; X_9 es Ala, Phe, Leu o His.

Además, también se prevé que el método de exhibición de fagos de la presente invención también se pueda utilizar para aislar las familias adicionales de moléculas de unión específicas para el polipéptidos similares al factor VIII y factor VIII .

Las moléculas de unión más preferidas para el aislamiento y/o purificación del polipéptidos similares al factor VIII y factor VIII , incluyendo especialmente REFACTO® mencionados anteriormente, a partir de una solución incluyen los siguientes polipéptidos;

Soluciones de las que el polipéptidos similares al factor VIII y factor VIII pueden ser aislados y purificados incluyen, pero no se limitan a, sangre, fracciones de sangre, y los sobrenadantes de cultivo de células recombinantes que contienen un polipéptido similar al factor VIII o factor VIII producido y secretado por la célula huésped recombinante.

La presente invención se refiere a un método para identificar y aislar moléculas de unión de factor VIII a través de la tecnología de exhibición de fagos. Más específicamente, moléculas de unión al factor VIII y similares al factor VIII que tienen características específicas y predeterminadas de unión y de elución se pueden seleccionar de una biblioteca de moléculas de unión, tal como una biblioteca de exhibición de fagos, por un método que comprende:

(a) seleccionar una primera condición de solución (es decir, las condiciones de unión) a la que se desea que una molécula de unión debe exhibir una afinidad para un polipéptido similar al factor VIII o factor VIII, formando un complejo de afinidad;
(b) seleccionar una segunda condición de solución (es decir, las condiciones de liberación) a la que se desea que la molécula de unión se disocie de un polipéptido similar al factor VIII o factor VIII, en el que la segunda condición de solución es diferente en algún aspecto, (por ejemplo., temperatura, pH, concentración de disolvente, etc.) de la primera condición de solución;
(c) proporcionar una biblioteca de análogos del dominio parental de unión al factor VIII, en la que cada análogo difiere de dicho dominio de unión parental mediante 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 un polipéptido similar al factor VIII o factor VIII en la primera condición de solución bajo condiciones adecuadas para formar un complejo entre la molécula de unión y un polipéptido similar al factor VIII o factor VIII;
(e) retirar de la solución los miembros no unidos (análogos) de la biblioteca de dominios de unión;
(f) someter los complejos de polipéptidos similares al factor VIII o factor VIII que se conservan de la etapa (e) a la segunda condición de solución para la disociación de algunas de la molécula de unión / complejos de factor VIII (o polipéptido similar al factor VIII);
(g) recuperar los análogos de unión liberados bajo la segunda condición solución, en la que los análogos recuperados identifican moléculas de unión aisladas a similares a factor VIII o factor VIII.

Opcionalmente, el procedimiento anterior puede incluir pasos adicionales condición de liberación, es decir, someter opcionalmente los complejos de polipéptido similar a factor VIII o factor VIII que se conserven de la etapa (f) a una tercera condición de solución para disociar otros complejos restantes, que se puede recoger en un fracción separada de moléculas de unión del factor VIII liberadas bajo las segundas condiciones de la solución. Tal paso, si las condiciones son suficientemente rigurosas para disociar todos los complejos formados en la etapa (d), identificará las condiciones de solución adecuados para la regeneración de las matrices de unión utilizando las moléculas de unión aisladas de acuerdo a este proceso.

También se incluyen en la presente descripción moléculas de unión no peptídicas y polipéptidos modificados que se unen polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII , Un ejemplo de estas modificaciones es un péptido de bucle restringido con residuos de cisteína emparejados que forman enlaces disulfuro, modificado en los residuos de cisteína por sustitución de una de las cisteínas con aminoácidos no naturales capaces de condensación con la otra cadena lateral de cisteína para formar un puente tioéter estable. Tales análogos tioéter cíclicos de péptidos sintéticos se describen en la publicación del PCT WO 97/46251, incorporada aquí por referencia. Otras modificaciones contemplados específicamente incluyen las sustituciones de aminoácidos específicas para conferir estabilidad u otras propiedades sin afectar significativamente a la unión del factor VIII, por ejemplo, la sustitución de Glu-Pro por Asp-Pro para reducir la labilidad ácida); modificaciones N-terminales o C-terminales para incorporar enlazadores tales como segmentos poli-glicina y alteraciones para incluir grupos funcionales, especialmente, funcionalidades hidrazida (-NH-NH_2) por ejemplo, para ayudar en la inmovilización de polipéptidos de unión sobre soportes sólidos según la presente invención.

La presente descripción incluye una composición de materia que comprende ácidos nucleicos aislados, preferiblemente ADN, que codifican moléculas de unión de la presente invención.

La presente descripción proporciona un método para detectar un factor VIII o péptido similar a factor VIII en una solución que se sospecha que los contiene, comprende poner en contacto la solución con una molécula de unión y determinar si se ha formado un complejo de unión.

La presente invención se refiere a un método para la purificación de factor VIII o un polipéptido similar a factor VIII partir de una solución que lo contiene, que comprende las etapas:

(a) poner en contacto una solución que contiene factor VIII o un polipéptido similar a factor VIII con una molécula de unión de acuerdo con esta invención bajo condiciones de solución que conduzcan a la formación de un complejo de unión compuesto por el factor VIII o un polipéptido similar a factor VIII y la molécula de unión;
(b) separar los complejos de los componentes de no unión de la solución;
(c) disociar el polipéptido similar al factor VIII o factor VIII de la molécula de unión; y
(d) recoger el polipéptido similar al factor VIII o factor VIII disociado, purificado.

También previsto por la presente invención es un método para aislar péptidos similares al factor VIII y factor VIII que comprende:

(a) inmovilizar una molécula de unión de acuerdo con la invención sobre un soporte sólido,
(b) poner en contacto una solución que contiene el polipéptido similar al factor VIII o solución que contiene el VIII con el soporte sólido,
(c) eliminar los componentes no unidos de la solución, y
(d) eluir el polipéptido similar al factor factor VIII o factor VIII a partir del soporte sólido.

Definiciones

Como se utiliza aquí, el término "recombinante" se utiliza para describir los ácidos nucleicos alterados de forma no natural o manipulados, células huésped transfectadas con ácidos nucleicos exógenos, o polipéptidos expresados de forma no natural, a través de la manipulación de ADN aislado y la transformación de las células huésped. Recombinante es un término que abarca específicamente las moléculas de ADN que se han construido *in vitro* usando técnicas de ingeniería genética, y el uso del término "recombinante" como un adjetivo para describir una molécula, construcción, vector, célula, polipéptido o polinucleótido excluye específicamente tales moléculas, construcciones, 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 envoltura protectora construida mediante la agregación de un número de moléculas diferentes de proteína. Los términos "bacteriófago" y "fago" se utilizan aquí de forma intercambiable.

El término "polipéptido similar a factor VIII" se usa para referirse a una forma modificada o truncada del factor natural VIII o al factor VIII recombinante de longitud completa, que el polipéptido similar al factor VIII retiene las propiedades procoagulantes del factor VIII. Ejemplos de polipéptidos similares al factor VIII son aquellos fragmentos de factor VIII activos y derivados de factor VIII descritos en las patentes citadas anteriormente Andersson y otros, Toole, y Almstedt y otros. El término "factor VIII diana" a continuación se usa a veces para referirse colectivamente a al polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII contenidos en una solución o producción de corriente de alimentación.

El término "molécula de unión", como se usa aquí, 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 al factor VIII" es una molécula de unión que forma un complejo con el factor VIII. Los ejemplos específicos de moléculas de unión de factor VIII son los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, Sec. con núms. de ident.: 1-32) y bacteriófagos que presentan cualquiera de tales polipéptidos. También se incluyen dentro de la definición de moléculas de unión al factor VIII los polipéptidos derivados de o que incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos según la fórmula I, II o III, anteriormente, y tales polipéptidos que han sido modificados para obtener resultados particulares. Los ejemplos específicos de las modificaciones contempladas son sustituciones de aminoácidos C-terminal o N-terminal o alargamientos de cadena polipeptídica con el fin de enlazar la porción de unión a un soporte cromatográfico u otro sustrato, y sustituciones de pares de residuos de cisteína que normalmente forman enlaces disulfuro, por ejemplo con residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales reactivas que no ocurren naturalmente, con el propósito de formar un enlace más estable entre aquellas posiciones de aminoácidos que el enlace disulfuro anterior. Todas estas moléculas de unión modificadas también se consideran moléculas de unión según esta invención mientras conserven la capacidad de unirse al polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

La presente invención hace posible la detección o purificación altamente selectiva del polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII en o a partir de soluciones que los contienen.

El factor VIII y los péptidos similares al factor VIII pueden ser producidos en cualquier forma conocida, incluyendo la síntesis química; la producción en células huésped transformadas; secreción al medio de cultivo por células de origen natural o de forma recombinante en bacterias transformadas, levaduras, hongos, células de insectos y células de mamíferos; secreción a partir de organismos genéticamente modificados (por ejemplo, mamíferos transgénicos); o en fluidos o tejidos tales como sangre, plasma, etc. La solución que contiene el factor VIII crudo como se produce inicialmente (es decir, la solución de producción) a veces se conoce como la "corriente de alimentación".

Cada método de producción de factor VIII (o un polipéptido similar al factor VIII) produce factor VIII en una corriente de alimentación que contiene, además, una serie de impurezas (con respecto al factor VIII). Uno de los propósitos de la presente invención es producir ligandos de afinidad y preparaciones (tales como medios de cromatografía) que comprenden tales ligandos que permiten la purificación rápida y altamente específica del factor VIII a partir de una corriente de alimentación en particular. Los ligandos de afinidad del factor VIII obtenidos en este documento pueden ser adaptados para el aislamiento de factor VIII a partir de una corriente de alimentación particular, bajo condiciones específicas preseleccionadas. Si se utiliza un método de producción alternativo para el factor VIII, produciendo una corriente de alimentación diferente, puede ser necesario un conjunto distinto de ligandos de afinidad para alcanzar el mismo nivel de purificación. El nuevo conjunto de ligandos se puede obtener fácilmente siguiendo los procedimientos descritos en el presente documento.

Las moléculas de unión a factor VIII de la invención se unen al factor VIII con alta afinidad, comparable o superior a otras proteínas tales como anticuerpos conocidos por unirse al factor VIII. Además, ligandos de afinidad preferidas descritas en el presente documento liberan el factor VIII intacto y en forma activa bajo condiciones de liberación específicos.

Selección de condiciones de Unión y Liberación

Moléculas de unión a polipéptido se aislaron de acuerdo con la presente invención usando la tecnología de exhibición de fagos, como una forma para identificar péptidos de unión a factor VIII que exhiben propiedades preseleccionadas de unión y liberación particulares. De acuerdo con esta metodología, dos condiciones de solución pueden ser preseleccionadas, es decir, las condiciones de unión y las condiciones de liberación. Las condiciones de unión son un conjunto de condiciones de solución bajo las cuales se desea que un polipéptido de unión descubierto se unirá el factor VIII diana (o polipéptidos similares a factor VIII); las condiciones de liberación son un conjunto de condiciones de solución bajo las cuales se desea que un polipéptido de unión descubierto no se unirá el factor VIII (es decir, se disociará de factor VIII). Las dos condiciones pueden seleccionarse para adaptarse a cualquier criterio del practicante, tales como la facilidad de alcanzar las condiciones, la compatibilidad con otras etapas de purificación, el coste reducido de la conmutación entre las condiciones en comparación con otros medios de afinidad, etc. Preferiblemente, se seleccionan las dos condiciones de solución a fin de no afectar negativamente a la estabilidad o actividad de la proteína diana (polipéptido similar a factor VIII o factor VIII) y con el fin de variar significativamente con respecto a al menos un parámetro de solución. por ejemplo, en la realización de la detección de los péptidos de unión adecuados descritos en el presente documento, se seleccionaron aglutinantes que se disociaban de la diana en presencia de un tampón que contiene glicol de etileno, o condiciones de bajo pH (es decir, pH 2), o combinaciones de estas condiciones, que diferían de las condiciones empleadas para la unión. Otro parámetro que se podría variar ventajosamente es la concentración de una sal, por ejemplo NaCl, en los tampones de unión y elución.

Selección de un Dominio de Unión Parental

En conjunción 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 una plantilla estructural para las moléculas de unión creadas que presentan las capacidades deseadas de unión y liberación. 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 basándose en el conocimiento de una interacción conocida entre el dominio de unión parental y el factor VIII, pero esto no es crítico. De hecho, no es esencial que el dominio de unión parental tenga ninguna afinidad por el factor VIII en absoluto: Su propósito es proporcionar una estructura de la que una multiplicidad de análogos (una "biblioteca") puede ser generada, que multiplicidad de análogos incluirá uno o más análogos que exhiban las propiedades de unión y liberación deseadas (y para cualquiera de las otras propiedades seleccionadas). Las condiciones de unión y las condiciones de liberación discutidas *supra* se pueden seleccionar con el conocimiento del polipéptido exacto que servirá como el dominio de unión parental, o con el conocimiento de una clase de proteínas o dominios a los que el dominio de unión parental pertenece, o de forma completamente independiente de la elección del dominio de unión parental. Del mismo modo, las condiciones de unión y/o liberación

pueden seleccionarse con respecto a las interacciones conocidas entre un dominio de unión y el factor VIII, por ejemplo, para favorecer la interacción en una o ambas de las condiciones de la solución, o pueden ser seleccionadas sin tener en cuenta tales interacciones conocidas. Del mismo modo, el dominio de unión parental puede ser seleccionado teniendo en cuenta o no las condiciones de unión y/o liberación, aunque hay que 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 naturaleza del dominio de unión parental influye en gran medida en las propiedades de los péptidos derivados (análogos) que se probarán frente a la molécula de factor VIII. Al 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 el factor VIII y los análogos entren en contacto. En las modalidades preferidas, por ejemplo, los análogos se generarán mediante inserción de ADN sintético que codifica el análogo en un paquete genético replicable, lo que resulta en la presentación del dominio en la superficie de un microorganismo, tales como el fago M13, usando técnicas como se describe, por ejemplo, en Kay y otros, Exhibición de fagos of Peptide and Proteins: A Laboratory Manual, (Academic Press, Inc.; San Diego 1996) y U.S. Pat. No. 5,223,409 (Ladner y otros.).

Para la formación de bibliotecas de exhibición de fagos, se prefiere usar polipéptidos estructurados como la plantilla del dominio de unión, en oposición a, péptidos lineales no estructurados. La mutación de residuos de superficie en una proteína normalmente tendrá poco efecto sobre la estructura global o las propiedades generales (tales como tamaño, estabilidad, y la temperatura de desnaturalización) de la proteína; mientras que al mismo tiempo la mutación de residuos de superficie puede afectar profundamente las propiedades de unión de la proteína. Cuanto más firmemente un segmento de péptido esté restringida, menos probable es que se una a cualquier diana particular. Si no se unen, sin embargo, es probable que la unión sea más estricta y más específica. Por lo tanto, se prefiere seleccionar un dominio de unión parental y, a su vez, una estructura para los análogos de polipéptidos, que esté limitado dentro de un marco que tenga un cierto grado de rigidez.

Preferiblemente, el dominio de la proteína que se utiliza como la plantilla o dominio parental para generar la biblioteca de análogos de dominio será una pequeña proteína o polipéptido. Proteínas o polipéptidos pequeños ofrecen varias ventajas sobre las proteínas grandes: En primer lugar, se reduce la masa por sitio de unión. Dominios de proteínas altamente estables que tienen bajo peso molecular, por ejemplo, dominios de Kunitz (~ 7 kDa), dominios Kazal (~ 7 kDa), *Cucurbita maxima* dominios de inhibidor de tripsina (CMTI) (~ 3,5 kDa), y endotelina (~ 2 kDa), pueden mostrar mayor unión por gramo que los anticuerpos (150 kDa) o anticuerpos de cadena simple (30 kDa). En segundo lugar, la posibilidad de unión no específica se reduce debido a que hay menos superficie disponible. En tercer lugar proteínas pequeñas o polipéptidos pueden ser diseñados para tener sitios de fijación únicos de una forma que es impracticable para proteínas más grandes o anticuerpos. por ejemplo, proteínas pequeñas pueden ser diseñadas para tener lisinas sólo en los sitios adecuados para la inmovilización (por ejemplo, a una matriz de cromatografía), pero esto no es factible para los anticuerpos. En cuarto lugar, una estructura polipeptídica restringida es más probable que conserve su funcionalidad cuando se transfieren con el dominio estructural intacto de un marco a otro. Por ejemplo, la estructura del dominio de unión es probable que sea transferible desde el marco utilizado para la presentación en una biblioteca (por ejemplo, presentado en un fago) a una proteína aislada removida del marco de presentación o inmovilizada en un sustrato cromatográfico.

La inmovilización de los polipéptidos según la invención se contempla, por ejemplo, en matrices cromatográficas para formar medios de separación de factor VIII eficientes para soluciones tales como sangre total o medios de cultivo acondicionados que contienen el factor VIII secretado por una célula huésped transformante. Al seleccionar plantillas de dominio de unión apropiadas, se pueden aislar los polipéptidos de unión que tenga una sola cisteína libre (no asociada con otra cisteína que normalmente forman un enlace disulfuro). Tales polipéptidos tiol-funcionales pueden ser utilizados para la inmovilización altamente estable a sustratos mediante la formación de un tioéter con yodoacetamida, ácido yodoacético o grupos de ácido carboxílico α-yodo similares.

Del mismo modo, el grupo carboxilo C-terminal del dominio del polipéptido puede ser convertido a una hidrazida (-NH-NH_2), para la reacción con un sustrato de aldehído funcional u otro sustrato amina reactiva. Esta técnica es preferida.

Hay muchos dominios proteicos pequeños estables adecuados para usar como dominios de unión parentales y para los cuales la siguiente información útil está disponible: (1) secuencia de aminoácidos, (2) secuencias de varios dominios homólogos, (3) la estructura tridimensional, y/o (4) datos de estabilidad en un rango de pH, temperatura, salinidad, disolvente orgánico, concentración de oxidante. Algunos ejemplos son: los dominios Kunitz (58 aminoácidos, 3 puentes disulfuro), *Cucurbita maxima* dominios inhibidores de tripsina (31 aminoácidos, 3 puentes disulfuro), dominios relacionados con guanilina (14 aminoácidos, 2 puentes disulfuro), los dominios relacionados con la enterotoxina termoestable IA de bacterias gram negativas (18 aminoácidos, 3 puentes disulfuro), dominios EGF (50 aminoácidos, 3 puentes disulfuro), dominios kringle (60 aminoácidos, 3 puentes disulfuro), dominios de unión a carbohidratos fúngicos (35 aminoácidos, 2 puentes disulfuro), dominios de endotelina (18 aminoácidos, 2 puentes disulfuro), y dominio estreptocócico T de unión a IgG (35 aminoácidos, no hay puentes disulfuro). La mayoría, pero no todos ellos contienen enlaces disulfuro que mantienen y

estabilizan la estructura. El dominio de unión parental también puede basarse en un solo bucle (un disulfuro) de una microproteína que es homólogo a un dominio de proteína conocida o no. por ejemplo, se usaron bucles restringidos de 7 a 9 aminoácidos para formar bibliotecas para el aislamiento de moléculas de unión a factor VIII y a polipéptidos similares a factor VIII, como se describe a continuación. Bibliotecas basados en estos dominios, preferentemente presentados por fagos, pueden fabricarse y utilizarse fácilmente para la selección de las moléculas de unión según la presente invención.

Proporcionar una Biblioteca de Dominios Parentales Análogos

Una vez que un dominio de unión parental ha sido seleccionado, se crea una biblioteca de moléculas de unión potenciales para el cribado contra una diana, en este caso el factor VIII y/o proteínas similares a factor VIII, en las condiciones de unión deseadas y (opcionalmente) las condiciones de elución (liberación) deseadas. La biblioteca se crea haciendo una serie de análogos, cada análogo correspondiente al dominio de unión parental excepto que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio. Se espera que las sustituciones de aminoácidos alteraren las propiedades de unión del dominio sin alterar significativamente su estructura, al menos para la mayoría de las sustituciones. Se prefiere que las posiciones de aminoácidos que se seleccionen para la variación (posiciones de aminoácidos variables) serán posiciones de los aminoácidos de superficie, es decir, las posiciones en la secuencia de aminoácidos de los dominios que, cuando el dominio está en su conformación más estable, aparecerán en la superficie exterior del dominio (es decir, la superficie expuesta a la solución). Más preferiblemente las posiciones de aminoácidos que se varíen estarán adyacentes o muy juntas, para maximizar el efecto de las sustituciones. Además, los aminoácidos adicionales se pueden agregar en la estructura del dominio de unión parental. En las modalidades preferidas, especialmente donde está disponible una gran cantidad de información relativa a las interacciones de factor VIII con otras moléculas, en particular el dominio de unión parental, esas posiciones de aminoácidos que son esenciales para las interacciones de unión se determinarán y conservarán en el proceso de construcción de la biblioteca analógica (es decir, los aminoácidos esenciales para la unión no serán variados).

El objeto de crear la biblioteca analógica 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 es el número de análogos en la biblioteca, mayor será la probabilidad de que al menos un miembro de la biblioteca se unirá al factor VIII y liberará en condiciones preseleccionadas o deseables para la liberación. Bibliotecas diseñadas siguiendo una estructura de plantilla determinada y limitando la variegación de aminoácidos en posiciones particulares son mucho más preferibles, ya que una sola biblioteca puede abarcar todos los análogos diseñados y las secuencias incluidas serán conocidos y se presentan en aproximadamente el mismo número. Por el contrario, la sustitución aleatoria en sólo seis posiciones en una secuencia de aminoácidos proporciona más de 60 millones de análogos, que es un tamaño de biblioteca que comienza a presentar limitaciones prácticas, incluso cuando se utilizan técnicas de detección tan poderosos como el exhibición de fagos. Las bibliotecas más grandes que esto plantearía problemas en el manejo, por ejemplo, los recipientes de fermentación tendrían que ser de un tamaño extraordinario, y lo más importante, la probabilidad de tener todas las variaciones de la secuencia de polipéptidos planificadas representados en la biblioteca preparada disminuirían drásticamente. Por lo tanto, se prefiere crear una biblioteca diseñada o sesgada, en la que las posiciones de aminoácidos designadas para la variación se consideran para maximizar el efecto de la sustitución en las características de unión del análogo, y los residuos de aminoácidos permitidos o previstos para su uso en sustituciones son limitados, por ejemplo, sobre la base de que son susceptibles de causar que el análogo se una en las condiciones de la solución a la que la biblioteca se examinará por aglutinantes.

Como se indicó anteriormente, las técnicas discutidas en Kay y otros, *supra,* y Ladner y otros, U.S. 5,223,409son particularmente útiles en la preparación de un biblioteca de análogos correspondientes a un dominio de unión parental seleccionado, que se presentarán análogos en una forma adecuada para el cribado a gran escala de un gran número de análogos con respecto a una molécula de factor VIII diana. El uso de paquetes genéticos replicables, y más preferiblemente de un bacteriófago, es un poderoso método de generación de nuevos entidades de unión a polipéptido que implica la introducción de un nuevo, segmento de ADN exógeno en el genoma de un bacteriófago (u otro paquete genético amplificable) de modo que el polipéptido codificado por el ADN no nativo aparezca en la superficie del fago. Cuando el ADN insertado contiene diversidad de secuencias, a continuación, cada destinatario de fago muestra una variante de la secuencia de plantilla (parental) de aminoácidos codificada por el ADN, y la población de fagos (biblioteca) exhibe un gran número de diferentes pero relacionados secuencias de aminoácidos.

En un procedimiento de detección para obtener aglutinantes del factor VIII de acuerdo con esta invención, una biblioteca de fagos se pone en contacto con y se permite la unión a una molécula de factor VIII diana, usualmente inmovilizado sobre un soporte sólido. Los no aglutinantes se separan de los aglutinantes. De varias formas, el fago unido se libera del factor VIII, se recoge y se amplifica. Dado que 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 génica que codifica una entidad de unión. Usando estas técnicas es posible recuperar un fago de unión que es de 1 en 20 millones en la población. Una o más bibliotecas, mostrando desde 10 hasta 20 millones o más polipéptidos de unión posibles cada una, se pueden cribar para encontrar

rápidamente aglutinantes de alta afinidad al factor VIII. Cuando el proceso de selección funciona, la diversidad de la población cae con cada ronda hasta que sólo quedan buenos aglutinantes, es decir, el proceso converge. Típicamente, una biblioteca de exhibición de fagos contendrá varios aglutinantes estrechamente relacionados (de 10 a 50 aglutinantes de 10 millones). Indicaciones de convergencia incluyen el aumento de la unión (medida por los títulos de fagos) y la recuperación de secuencias estrechamente relacionadas. Después que se identifica un primer conjunto de péptidos de unión, la información de la secuencia se puede utilizar para diseñar otras bibliotecas sesgadas para miembros con propiedades deseadas adicionales, por ejemplo, la discriminación entre el factor VIII y fragmentos particulares o impurezas estrechamente relacionadas en una corriente de alimentación en particular.

Estas técnicas hacen posible no sólo detectar un gran número de moléculas de unión potenciales, sino que sea práctico para repetir los ciclos de unión/elución y construir bibliotecas secundarias, sesgadas para el cribado de paquetes que muestren análogos que cumplan los criterios iniciales. Usando estas técnicas, una biblioteca sesgada analógica se puede cribar para revelar miembros que se unan firmemente (es decir, con alta afinidad) en las condiciones de detección.

Síntesis de Análogos de Polipéptidos

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, moléculas de unión adicionales para polipéptidos similares a factor VIII y/o factor VIII se pueden aislar de las bibliotecas de exhibición de fagos descritas en el presente documento u otras bibliotecas de exhibición de fagos o colecciones de moléculas de unión potenciales (por ejemplo, bibliotecas combinatorias de compuestos orgánicos, bibliotecas de péptidos aleatorios, etc). Una vez aislado, la secuencia de cualquier péptido de unión individual o la estructura de cualquier molécula de unión se puede analizar, y el aglutinante se puede producir en cualquier cantidad deseada usando métodos conocidos. por ejemplo, las moléculas de unión de polipéptidos descritos en este documento, ya que sus secuencias se conocen ahora, ventajosamente pueden ser producidos por síntesis química seguido por tratamiento bajo condiciones oxidantes apropiadas para obtener la conformación nativa, es decir, los enlaces disulfuro correctos. La síntesis puede llevarse a cabo mediante metodologías bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica (ver,Kelley y otros en Genetic Engineering Principles and Methods, (Setlow, J.K., ed.), Plenum Press, NY., (1990) vol. 12, págs. 1-19; Stewart y otros, Solid-Phase Peptide Synthesis (1989), W. H. Freeman Co., San Francisco). Las moléculas de unión de la presente invención se pueden preparar por síntesis o por semisíntesis química. Los métodos de síntesis o semisíntesis química permiten la posibilidad de que se incorporen residuos de aminoácidos no naturales.

Las moléculas de unión al polipéptido de la presente invención se preparan preferentemente usando la síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1963); Houghten, Proc. Natl. Acad, Sci. USA, 82: 5132 (1985)). La síntesis en fase sólida comienza en el terminal carboxi del polipéptido putativo por acoplamiento de un aminoácido protegido a una resina adecuada, que reacciona con un grupo carboxi del aminoácido C-terminal para formar un enlace que se escinde fácilmente después, tal como una resina de halometilo, por ejemplo, resina de clorometil o y resina de bromometilo, resina de hidroximetilo, resina de aminometilo, resina de benzhidrilamina, o resina de t-alquiloxicarbonil-hidrazida. Después de la eliminación del grupo protector α-amino con, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno y neutralización en, por ejemplo, TEA, el siguiente ciclo en la síntesis está listo para proceder. El α-amino restante y, secuencialmente si es necesario, aminoácidos con cadenas laterales protegidas se acoplan a continuación en el orden deseado por condensación para obtener un compuesto intermedio conectado a la resina. Alternativamente, algunos aminoácidos pueden acoplarse entre sí formando un oligopéptido antes de la adición del oligopéptido a la cadena polipeptídica en crecimiento en fase sólida.

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

Común a la síntesis química de péptidos es la protección de los grupos de cadena lateral reactivos de las diversas porciones de aminoácidos con grupos protectores adecuados en ese sitio hasta que el grupo se elimina en última instancia después que la cadena ha sido completamente ensamblada. También es común la protección del grupo α-amino de un aminoácido o un fragmento mientras que esa entidad reacciona en el grupo carboxilo, seguido por la eliminación selectiva del grupo α-amino-protector para permitir que la reacción posterior tenga lugar en ese punto. En consecuencia, es común que, como un paso en la síntesis, se produzca un compuesto intermedio que incluye cada uno de los residuos de aminoácidos localizados en la secuencia deseada en la cadena de polipéptido con varios de estos residuos que tienen grupos protectores de cadena lateral. Estos grupos protectores comúnmente entonces se retiran sustancialmente al mismo tiempo a fin de producir el producto resultante deseado después de la purificación.

Los grupos protectores típicos para proteger los grupos de cadena lateral de α- y ε-amino se ejemplifican por

benciloxicarbonilo (Z), isonicotiniloxicarbonilo (iNOC), O-clorobenciloxicarbonilo [Z(NO_2)], p-metoxibenciloxicarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, adamatiloxicarbonilo, 2-(4-bifenilo)-2-propiloxicarbonilo (Bpoc), 9-fluotenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfoniletoxicarbonilo (Msc), trifluoroacetil, fthalil, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo (NPS), difenilfosfinorionilo (Ppt), dimetilofosfinorionilo (Mpt), y similares.

Como grupos protectores para el grupo carboxi se pueden ejemplificar, por ejemplo, bencil éster (OBzl), ciclohexil éster (Chx), 4-nitrobencil éster (ONb), t-butil éster (Obut), 4-piridilmetil éster (OPic), y similares. Es deseable que los aminoácidos específicos tales como arginina, cisteína y serina que poseen un grupo funcional distinto de los grupos amino y carboxilo estén protegidos por un grupo protector adecuado según demande la ocasión. Por ejemplo, el grupo guanidino en la arginina puede protegerse con nitro, p-toluenosulfonilo, benciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p-metoxibencenosulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbencenosulfonilo (Mds), 1,3,5-trimetilfenilsulfonilo (Mts), y similares. El grupo tiol en la cisteína puede protegerse con p-metoxibencilol, trifenilmetil, acetilaminometilo etilcarbamoil, 4-metilbencilo, 2,4,6-trimetil-bencilo (Tmb), etc., y el grupo hidroxilo en la serina puede protegerse con bencilo, t-butilo, acetilo, tetrahidropiranilo, etc.

Después que la secuencia de aminoácidos deseada ha sido completada, el polipéptido intermedio se retira del soporte de resina por tratamiento con un reactivo, tal como HF líquido y uno o más limpiadores que contienen tio, que no sólo escinde el polipéptido de la resina, sino que también escinde todos los grupos protectores de cadena lateral restantes. Después de la escisión de HF, la secuencia de la proteína se lava con éter, se transfirió a un gran volumen de ácido acético diluido, y se agitó a un pH ajustado a aproximadamente 8.0 con hidróxido de amonio. Tras el ajuste del pH, el polipéptido toma su disposición conformacional deseada.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse comercialmente además por compañías que proporcionan la síntesis de polipéptidos como un servicio (por ejemplo, BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA).

Uso de las moléculas de unión en la detección o purificación.

Para la detección de polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII en una solución tal como sangre o medios condicionados sospechosos de que lo contienen, una molécula de unión según la invención puede ser marcada de manera detectable, por ejemplo, radiomarcada o marcada enzimáticamente, a continuación, en contacto con la solución, y después de ello la formación de un complejo entre la molécula de unión y el factor VIII diana se pueden detectar. Una molécula de unión a fago de acuerdo con la invención, es decir, un fago recombinante que presenta un polipéptido aglutinante del factor VIII en su superficie, puede formar un complejo con polipéptidos similares factor VIII y/o factor VIII que es detectable como un sedimento en un tubo de reacción, que puede ser detectado visualmente después de la sedimentación o centrifugación.

Alternativamente, un ensayo de tipo sándwich se puede usar, en el que una molécula de unión al factor VIII se inmoviliza sobre un soporte sólido tal como un tubo de plástico o bien, o una matriz cromatográfica tal como perlas de sefarosa, a continuación, la solución que se sospecha contiene el factor VIII diana se pone en contacto con la molécula de unión inmovilizada, los materiales no unidos son lavados, y polipéptidos similares a factor VIII o factor VIII acomplejados se detectan usando un reactivo de detección adecuado, tal como un anticuerpo monoclonal que reconoce el factor VIII diana, que es reactivo detectable por algunos medios convencionales conocidos en la técnica, incluyendo marcado de manera detectable, por ejemplo, radiomarcado o marcado enzimáticamente, como con peroxidasa de rábano picante, y similares.

Las moléculas de unión según esta invención serán extremadamente útiles para el aislamiento de polipéptidos similares al factor VIII y/o factor VIII por métodos de cromatografía de afinidad. Cualquier método convencional de cromatografía puede ser empleado. Preferiblemente, un ligando de afinidad de la invención se inmoviliza sobre un soporte sólido adecuado, por ejemplo, para el embalaje de una columna de cromatografía. El ligando de afinidad inmovilizado se puede cargar o en contactar con una corriente de alimentación en condiciones favorables para la formación de complejos molécula de unión / factor VIII (o polipéptidos similares a factor VIII). Los materiales no unidos pueden ser lavados, entonces el factor VIII (o polipéptido similar a factor VIII) se pueden eluir mediante la introducción de condiciones de solución que favorecen la disociación del complejo de unión.

Alternativamente, la cromatografía por lotes se puede llevar a cabo mezclando una solución que contiene el factor VIII diana y la molécula de unión, a continuación, aislar complejos del factor VIII diana y las moléculas de unión. Para este tipo de separación, se conocen muchos métodos. por ejemplo, la molécula de unión puede inmovilizarse sobre un soporte sólido, a continuación, separado de la corriente de alimentación junto con el factor VIII diana por filtración. O la molécula de unión se puede modificar con su propia etiqueta de afinidad, tal es una cola de poliHis, que se puede utilizar para unir el aglutinante después que los complejos se han formado utilizando una cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. Una vez separado, el factor VIII diana puede ser liberado de la molécula de unión en condiciones de elución y recuperarse en forma pura.

Cabe señalar que, aunque las condiciones de unión precisas fueron preseleccionadas en la obtención de polipéptidos de unión al factor VIII a descritos en el presente documento, su posterior uso en la purificación de afinidad puede revelar condiciones más óptimas de unión y liberar en las que el mismo ligando de afinidad aislado funcionará. Por lo tanto, no es crítico que la molécula de unión, después del aislamiento de acuerdo con esta invención, se emplee siempre sólo en las condiciones de unión y liberación que llevaron a su separación de la biblioteca.

El aislamiento de moléculas de unión a factor VIII de acuerdo con esta invención se ilustrará adicionalmente a continuación. Los parámetros específicos incluidos en los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la práctica de la invención, y no se presentan para limitar en modo alguno el alcance de la invención. Ejemplos que quedan fuera del alcance de las reivindicaciones se proporcionan como ejemplos de referencia.

Ejemplo 1: El aislamiento de Moléculas de Unión para un Polipéptido Similar a Factor VIII

Las técnicas descritas anteriormente se emplearon para aislar moléculas de unión de alta afinidad para ligandos para el polipéptido similar al factor VIII producido de manera recombinante que consiste en dos segmentos de factor VIII humano, es decir, aminoácidos 1-743 y 1638 a 2332 del factor VIII humano, como se describe en la patente de los EE.UU. núm. 5,661,008 (Almstedt y otros), obtenido bajo la designación comercial de REFACTO® de Genetics Institute, Inc. (Cambridge, MA). El objetivo REFACTO® se proporcionó a una concentración de aproximadamente 530 µg/ml (7800 IU/ml) en 19.4 mM His, 300 mM NaCl, 3.4 mM $CaCl_2$ y 0.1% Tween 80, pH 7.0.

Se construyeron tres genotecas, designadas TN7 (5 x 10^9 diversidad de la secuencia de aminoácido), TN8 (6 x 10^9 diversidad de la secuencia de aminoácido), y TN9 (5 x 10^9diversidad de la secuencia de aminoácido), para la expresión de los polipéptidos diversificados en al fago M13. Cada genoteca se tamizó para los aglutinantes para REFACTO® purificado. Cada una de las genotecas se construyó para exhibir una microproteína basada en un patrón de 11- o 12-aminoácidos. La genoteca TN7 utilizó una secuencia patrón de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (sec. con núm. de ident.: 33); la genoteca TN8 utilizó una secuencia patrón de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (sec. con núm. de ident.: 34); la genoteca TN9 utilizó una secuencia patrón de Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa (sec. con núm. de ident.: 35).

Tres rondas de cribado se llevaron a cabo para cada biblioteca. Al concluir la tercera ronda de selección los fagos eluidos se propagaron, y los aislados individuales de cada biblioteca (96 por condición de elución) fueron seleccionados al azar y se probaron mediante técnicas ELISA estándar para la unión al factor VIII diana. Los fagos unidos se detectaron con anticuerpo policlonal HRP anti-M13 conjugado (Pharmacia). TMB sustrato peroxidasa se utilizó para HRP en el mecanismo de detección de ELISA. El sustrato TMB produce un color azul después de la digestión peroxidasa. El color se cuantificó por absorbancia a DO_{630}. Los fagos aislados de que proporcionaron una señal significativa (DO_{630} > 0.25) por encima del fondo fueron considerados clones positivos. Se realizó la secuenciación del ADN de estas cepas para identificar el péptido presentado.

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos presentados se dedujeron de las secuencias de ADN obtenidos. Los datos de secuencia de los fagos aislados se agruparon por biblioteca y se ordenaron según el grado de similitud. La frecuencia a la que ninguna secuencia dada se obtuvo se anotó ya que esto indica la selección de un aglutinante específico. Los fagos aislados que tienen el mismo péptido presentado se encuentran presentes en las poblaciones de fagos obtenidos por ambos de los dos métodos de elución.

Tabla 1:	Secuencias de aminoácido de los polipéptidos de unión objetivo a partir de la genoteca TN7			
TN7 aislado	Secuencia	frecuencia (elución)	Señal ELISA	Sec. con núm. de ident.:
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 aminoácido de los polipéptidos de unión objetivo a partir de la genoteca TN8			
TN8 aislado	Secuencia	frecuencia (elución)	Señal ELISA	Sec. con núm. de ident.:
C10	His-Pro-Cys-Cly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-His	10/192 (EG/pH2)	1.0	10
B05	Arg-Gly-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Leu-Asp	2/192 (EG/pH2)	0.2	11
E04	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Ala-Ala	3/192 (EG/pH2)	0.3	12
F02	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Asn-Pro-CyS-Ala-His	5/192 (EG/pH2)	0.3	13
A02	His-Pro-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Phe-His	3/96 (EG)	0.7	14
H07	His-Ala-Cys-Gly-Ser-Th-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala	3/192	0.4	15
E02	His-Leu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pre-Cys-Asp-Ala	6/192 (EG/pH2)	0.4	16
C12	His-Leu-Cys-Phe-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-Asp-Ala	1/96 (EG)	0.4	17
A01	His-Gly-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala	4/192 (EG/pH2)	0.2	18
E01	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Asn-Pro-Cys-Pro-Arg	1/96 (pH2)	0.2	19
H08	His-Pro-Cys-Gly-Ala-Trp-Leu-Arg-Pro-Cys-Tyr-Asn	1/96 (EG)	1.0	20
A11/G 10	His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Leu-Ala	1/96 (EG)	0.3	21

Tabla 3 :	Secuencias de aminoácido de los polipéptidos de unión objetivo a partir de la genoteca TN9			
TN9 aislado	Secuencia	frecuencia (elución)	Señal ELISA	Sec. con núm. de ident.:
B04	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His	6/192 (EG/pH2)	0.8	22
G02	Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala-His-Cys-Leu	2/96 (EG)	0.2	23
B01	Phe-Cys-His-Val-Phe-Ris-Phe-Ser-His-Cys-Asp	5/192 (EG/pH2)	0.2	24
A01	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His	12/192 (EG/pH2)	1.2	25
E03	Phe-Cys-Trp-Val-Pbe-Asn-Phe-Ser-His-Cys-Ser	4/192 (EG/pH2)	1.1	26
C02	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Asp	5/96 (pH2)	0.4	27
E12	Pho-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Ser	6/96 (EG)	1.0	28
E09	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Gln-Cys-Ala	4/192 (EG/pH2)	1.1	29
D06	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-His-His-Cys-Phe	2/192 (EG/pH2)	0.3	30
C01	Phe-Cys-His-Val-Phe-Asn-Phe-Val-His-Cys-Ser	2/192 (EG/pH2)	0.5	31
H11	Phe-Cys-His-Val-Phe-Pro-Phe-Leu-His-Cys-Asp	2/192 (EG/pH2)	0.2	32

Ejemplo II: Preparación de Ligandos de Afinidad para un Factor VIII Diana

Basándose en los datos presentados anteriormente, se seleccionaron y sintetizaron nueve péptidos para la inmovilización sobre un material de matriz de afinidad. Los péptidos sintetizados se indican en la Tabla 4.

Tabla 4

Secuencia de Aminoácidos de los Ligandos de Afinidad y sus Densidades sobre un Soporte Sólido			
Ligando de afinidad	**Fago aislado**	**Secuencia (Bucle bisulfuro subrayado)**	**Densidad del Ligando mg/ml (µmol/ml)**
CS-453	C10-TN8	AEGTGDHPCGSWLRPCLHDPGPEGGGS-$NHMH_2$	2.64 (0.98)
CS-454	E02-TN8	AEGTGDHLCGAWFRPCDADPGPEGGGS-$NHNH_2$	1.79 (0.67)
CS-455	A09-TN7	AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGGS-$NHNH_2$	2.21 (0.83)
CS-456	A08-TN7	AEGTGDFGCSWLFPCPFDPGPEGGGS-$NHNH_2$	3.69 (1.43)
CS-458	B04-TN9	AEGTGDFCWVFAFDHCHDPGPEGGGS-$NHNH_2$	3.15 (1.17)
CS-459	E09-TN9	AEGTGDFCWVFPEQHCADPGPEGGGS-$NHNH_2$	2.72 (1.02)
CS-460	D06-TN9	AEGTGDFCWVFPFHHCFDPGPEGGGS-$NHNH_2$	4.24 (1.54)
GI-1	C05/G10-TN7	Acetil-AEGTGDRLCSWVSPCSADPEGGGSK	0.83 (0.32)
GI-2	A11/G10-TN8	Acetil-AEGTGDHRCGSWLHPCLADPEGGGSK	0.43 (0.16)

Los péptidos de afinidad de la Tabla 4 se identifican, en el orden anterior, con las sec. con núms. de ident.: 36-44.

Los nueve primeros péptidos de afinidad fueron producidos por métodos de síntesis clásicos en fase sólida como se describe anteriormente. Para facilitar la inmovilización sobre un soporte sólido, una región enlazadora corta de siete aminoácidos hidrazida-funcional (-PGPEGGGS-$NHNH_2$; SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 45) fue incorporada en el extremo carboxi-terminal de siete de los péptidos (véase la Tabla 4). Un enlazador de inmovilización alternativo se utilizó con dos de los péptidos (GI-1 y GI-2 en la Tabla 4), es decir, -PEGGGSK; (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 46), exhibiendo una lisina C-terminal para la inmovilización y un amino-terminal acetilado.

Los ligandos candidatos se inmovilizaron sobre una resina cromatográfica de etilenglicol metacrilato formil-sustituido (Toyopearl Formyl 650-M, tamaño de poro de ~1000Å; TosoHaas, Montgomeryville, PA). Los péptidos que contienen hidrazida se inmovilizaron para facilitar la formación del enlace hidrazona, los péptidos GI-1 y -2 se inmovilizaron mediante aminación reductora usando $NaCNBH_3$. La cantidad de polipéptido inmovilizado sobre el soporte sólido se determinó mediante la cuantificación de la cantidad de polipéptido libre restante en solución. La cantidad de ligando inmovilizado por ml de resina estaba en el intervalo de 0.7-1.5µmol para los péptidos de hidrazina inmovilizados.

Los nueve péptidos fueron evaluados por cromatografía de afinidad por su capacidad para capturar el REFACTO® descrito en el Ejemplo I, bajo condiciones específicas de unión y 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 NH_4OAc, pH 6.3, 0.8M NaCl, 1M Sorbitol, 0.02% Tween 80, 3mM EDTA, 5mM $CaCl_2$
tampón de elución A	50% etilenglicol, 20mM His, 0.25M NaCl, 20mM $CaCl_2$, 0.01% Tween 80, pH
tampón de elución B	0.35M $CaCl_2$, 20mM His, 0.3M NaCl, 0.1% Tween 80, pH 7
pH 2 Limpio	100nM Gly, 1M NaCl, pH 2

El polipéptido similar a factor VIII (REFACTO®) se diluyó en tampón SP a una concentración de 150 µg/ml. Las resinas de afinidad (~ 350 µl) se empaquetaron en columnas de vidrio, y aproximadamente 150 µg del factor VIII diana se aplicó a las columnas de afinidad preparadas con un flujo de 200µl/minuto (velocidad lineal de 170 cm/hora). El material unido se eluyó secuencialmente con los tampones como se muestra en la Tabla 5, y la elución de proteínas se controló mediante absorbancia UV a 280 nm. Las fracciones se recogieron y la masa y la actividad del polipéptido similar factor VIII recuperado se determinó por HPLC de fase reversa y mediante ensayo enzimático.

Para la determinación de la masa, una curva estándar con REFACTO® (0-200µg) fue generada y la cantidad presente en cada fracción se calculó de acuerdo con técnicas bien conocidas. HPLC de fase reversa en presencia de EDTA 20 mM fue usado para romper la molécula REFACTO® en sus subunidades componentes, que se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo/0.01% de TFA. El ensayo de actividad fue un ensayo basado en el Factor IX-, X. Los resultados para cada resina de afinidad se exponen más abajo (Tabla 6).

Tabla 6

Resumen de los Datos Obtenidos con Nueve Ligandos de Afinidad						
		Condición de elución (% Recuperación)				
Péptido	**Prueba**	**Flujo**	**a**	**B**	**pH2**	**Total**
Resina sin tratar	Actividad RP-HPLC	64.4	2.8	0	0	67.2
		64.4	0.6			65.0
CS-453	Actividad RP-HPLC	0	43.2	0	0	43.2
		0	26.4			26.4
CS-454	Actividad RP-HPLC	2.5	45.1	0	0	47.6
		2.2	42.4			44.6
CS-455	Actividad RP-HPLC	65.8	1.4	0	0	67.2
		61.6	1.3			62.9
CS-456	Actividad RP-HPLC	3.4	44.8	0	0	48.2
		4.8	43.0			47.8
CS-458	Actividad RP-HPLC	1.8	54.3	0	0	56.1
		1.4	55,6			57.0
CS-459	Actividad RP-HPLC	1.5	42.1	0	0	43.7
		6.4	31.2			37.6
CS-460	Actividad RP-HPLC	24.6	28.8	0	0	53.4
		28.4	0			28.4
GI-1	Actividad RP-HPLC	65.7	0	0	0	65.7
		64.0	0			64.0
GI-2	Actividad RP-HPLC	31.3	28.1	0	2.0	61.4
		33.7	20.3			53.9

En general, la cantidad total de factor VIII diana recuperada después de la cromatografía sobre los nueve ligandos estaba en el rango de 40-67%. Los ligandos de polipéptido CS-453, CS-454, CS-456 y CS-459 capturaron prácticamente todo el factor VIII diana aplicado, con material unido eluido en presencia de etilenglicol. No se encontró actividad en el eluato de pH 2, por lo tanto, se supuso que ninguna diana permaneció unida al ligando, La incapacidad de las resinas CS-455 y GI-1 para capturar la diana puede ser debido a la degradación o inestabilidad del péptido, o a la baja densidad del ligando en el soporte.

Ejemplo III: Comparativo Unión de nhfVIII y REFACTO®

Se realizaron experimentos para demostrar que los ligandos de polipéptido inmovilizado del Ejemplo II unen y liberan el factor VIII humano nativo (nhfVIII) en condiciones similares y con rendimientos similares a los observados con REFACTO® el polipéptido similar a factor VIII.

Para estos experimentos, el nhfVIII se obtuvo de American Diagnostica, Inc. (Greenwich, CT; producto # 408 nat) en forma de un polvo liofilizado que contiene agentes estabilizantes. El nhfVIII se reconstituyó según las instrucciones del fabricante en un tampón de reconstitución (72 mM NH_4OAc, pH 6.3, 360 mM NaCl, 0.04% Tween 80 (Tampón 1).
Un kit comercial ELISA (kit IMUBIND fVIII ELISA, Producto # 884, American, Inc., Greenwich, CT) desarrollado para detectar el factor VIII se utilizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante, a fin de detectar tanto la REFACTO® como las

dianas nhfVIII. El kit emplea un ensayo de ELISA de sándwich en el que la diana es capturada por un anticuerpo monoclonal inmovilizado y la diana capturada se detecta con un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). La adición del sustrato de peroxidasa y su posterior reacción con el HRP produce un color azul (detectado a 630 nm) que cambia a amarillo (detectado a 450 nm) tras la adición de la solución de parada de ácido sulfúrico 0.5 N. La respuesta de color se calibra con estándares de factor VIII proporcionados por el fabricante.

La unión de REFACTO® se probó en el Tampón 1. La unión de REFACTO® y de nfhVIII se probó 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 medio Toyopearl formilo 650-M . La densidad del ligando para cada polipéptido fue 1.79mg/ml (0.67 µmol/ml), 3.69 mg/ml (1.43 µmol/ml) y 3.15 mg/ml (1.17 µmol/ml) respectivamente.

Para cada uno de los tres péptidos inmovilizados probados, péptido-cuentas de 200 ml de una suspensión al 50% de la suspensión polipéptidos acoplados a Toyopearl se centrifugaron brevemente (30 segundos a 2000 x g a temperatura ambiente), se retiró el líquido sobrenadante, y las perlas (sedimentos) se lavaron dos veces. Para cada lavado, las perlas se resuspendieron en 500 µl de tampón 1 y se centrifugaron como antes.

La solución madre de REFACTO® se diluyó a una concentración final de 200 U/ml en Tampón 1 y 250 µl de la solución diluida (~50 U total) se añadió a una sedimento lavado de cada uno de los péptidos-cuentas. La suspensión se incubó en un mezclador orbital a TA durante una hora, después de cada período de unión las perlas se sedimentaron por centrifugación (30 segundos, 2000 x g) y las soluciones sobrenadantes, que representan la fracción no unida ("no unido" en la Tabla 7, abajo), fueron removidos y retenidos para el ensayo de actividad de factor VIII no unido.

Las perlas sedimentadas se lavaron una vez mediante la adición de 250 µl de tampón 1, se mezclaron brevemente y la suspensión se centrifugó como antes. Las soluciones de sobrenadante ("Lavado" en la Tabla 7) fueron removidos y retenidos para el ensayo de actividad del factor VIII.

Los sedimentos lavados se resuspendieron en 250 µl de tampón A (20 mM de L-Histidina-HCl, 250 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$, , 0.01% de Tween 80,50% de etilenglicol, pH 6.3) y se incubó en un mezclador orbital durante 15 minutos a temperatura ambiente Al final del período de elución, las suspensiones se centrifugaron como anteriormente. Las soluciones de sobrenadante ("Eluato" en la Tabla 7) fueron removidos y retenidos para el ensayo de actividad del factor VIII eluido.

La solución de partida (diluido) REFACTO® (entrada) y cada muestra (No unido, Lavado, y Eluato) tomada como se describe más arriba se han diluido 1: 1400 en Diluyente de Ensayo (proporcionado con el kit), después se sometió a ELISA usando el kit comercial de ensayo de factor VIII. La Tabla 7 resume los resultados.

Tabla 7

Unión y Elución por Lotes de REFACTO® con Ligandos de Polipéptidos Inmovilizados					
Ligando péptido inmovilizado	**% de entrada recuperado en:**				
	Entrada	**No unido**	**Lavado**	**Eluato**	**Total**
CS-454	100	24	12	49	85
CS-456	100	47	20	24	91
CS-458	100	20	10	47	76

Para cada polipéptido inmovilizado probado, casi todo el REFACTO® (> 75%) añadido a la reacción de unión se recuperó en las fracciones No unido, Lavado, y Eluato. Una pequeña cantidad de material (10% -25%) puede haber sido retenido en las cuentas siguiendo la elución.

Luego las perlas de afinidad se regeneraron con un lavado en 50% de etilenglicol, 20mM His, 0.25M NaCl, 20mM $CaCl_2$, 0.01% Tween 80, pH 7, y dos lavados con 250 µl de 30mM $HiPO_4$, 1M NaCl, pH 2 (15 minutos para cada lavado). Después de los lavados a pH 2, las perlas se lavaron una vez en PBS que contenía 0.05% de azida y se almacenaron a 4℃.

Una muestra de nhfVIII se diluyó a una concentración final de 100 U/ml mediante la adición de 2.32 ml de H_2O, 180 µl 1M

NH_4OAc, pH 6.3 (to 72 mM), y 1 µl Tween 80 (a 0,04%). La solución madre de REFACTO® se diluyó a 100 U/ml en un Tampón 1 modificado, en el cual la concentración de NaCl se redujo de 660mM a 330mM.

Los péptidos inmovilizados se ensayaron para la unión a nhFVIII en comparación con REFACTO®. Como control no unido, un polipéptido de la biblioteca TN9 (B10), que se une a una diana no relacionada y no se une a una diana del factor VIII, se inmovilizó sobre las mismas perlas de metacrilato, como se describió anteriormente. A continuación, las soluciones nhfVIII y REFACTO® se mezclaron con perlas de afinidad regeneradas teniendo los ligandos CS-454, CS-456 y CS-458 en un procedimiento de purificación comparativo de lotes. Las condiciones de reacción se exponen en la Tabla 8.

TABLA 8
Condiciones de reacción para la prueba de unión de nhfVIII

Ligando péptido inmovilizado	Volumen de la suspensión de perlas (µl)	Objetivo (100 U/ml)	Volumen de reacción (µl)
CS-454	200	hfVIII	500
CS-456	200	hfVIII	500
CS-458	200	hfVIII	500
TN9-B10	200	hfVIII	500
CS-458	100	REFACTO®	250
TN9-B10	100	REFACTO®	250

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

Tabla 9
Unión y elución por lotes de nhfVIII y REFACTO® con ligandos de polipéptidos inmovilizados

Ligando péptido inmovilizado	DIANA	% 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 polipéptidos inmovilizados, CS-458, CS-454 y CS-456 unen y liberan nhfVIII en condiciones similares y con rendimientos similares a los observados previamente con un polipéptido similar a factor VIII.

Después de la descripción anterior, las características importantes para moléculas de unión de afinidad que permiten la detección o separación de factor VIII o polipéptidos similares a factor VIII en o desde cualquier solución pueden ser apreciados. Modalidades adicionales de molécula de unión de la invención y métodos alternativos adaptados a una solución particular o corriente de alimentación serán evidentes del estudio de la descripción anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dyax Corporation

<120> Moléculas de unión para las proteínas similares al Factor VIII y Factor VIII humano

<130> 7293(4) E
<140> EP 09155033.5

<141> 2006-05-02

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

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa en la posición 1 puede ser Arg, Phe, His o Pro; no se implica ninguna información con respecto a la frecuencia relativa de los residuos alternativos, Xaa en la posición 2 puede ser Ser, Gly, Leu o His; no se implica ninguna información con respecto a la frecuencia relativa de los residuos alternativos.
<400> 1

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

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<220>
<221> VARIANTE

<222> (1)..(2)
<223> xaa1 es Arg o His; Xaa2 es Ala, Arg, Gly, Leu o Pro

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(5)
<223> Xaa4 es Gly o Phe; Xaa5 es Ala o Ser

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(8)
<223> Xaa7 es Leu o Phe; Xaa8 es Arg, Asn o His

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(12)
<223> Xaa11 es Ala, Asp, His, Leu, Phe, Pro o Tyr; Xaa12 es Ala, Arg, Asn, Asp o His
<400> 2

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

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa3 es His o Trp

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa5 es His o Phe; Xaa6 es Ala, Asn, His o Pro

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa8 es Ala, Asn, Asp, Gln, His, Leu, Ser o Val

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> xaa11 es Ala, Asp, His, Leu, Phe o Ser

<400> 3

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

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 4

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

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 5

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

<210> 6
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 6

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

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 7

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

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 8

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

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 9

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

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 10

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

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 11

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

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 12

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

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético
<400> 13

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

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 14

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

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 15

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

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 16

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

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 17

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

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 18

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

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético
<400> 19

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

<210> 20
<211> 12

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 20

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

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético
<400> 21

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

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 22

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

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 23

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

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 24

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

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 25

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

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 26

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

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 27

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

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 28

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

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 29

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

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 30

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

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético

<400> 31

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

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: péptido bucle de unión sintético
<400> 32

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

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: patrón para el péptido bucle de unión sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(11)
<223> aminoácido posiciones 3 y 9 son Cys invariable; todas las otras posiciones Xaa son variadas pero no Cys, para proporcionar una genoteca de 5x10(9) péptidos diferentes basado en la secuencia patrón

<400> 33

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

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: patrón para el péptido bucle de unión sintético
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(12)
<223> aminoácido posiciones 3 y 10 son Cys invariable; todas las otras posiciones Xaa son variadas pero no Cys, para proporcionar una genoteca de 6x10 (9) péptidos diferentes basado en la secuencia patrón

<400> 34

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

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: patrón para el péptido bucle de unión sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(11)

<223> aminoácido posiciones 2 y 10 son Cys invariable; todas las otras posiciones Xaa son variadas pero no Cys, para proporcionar una genoteca de 5x10(9) péptidos diferentes basado en la secuencia patrón

<400> 35

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

<210> 36
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 36

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

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

<210> 37
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligandode afinidad al Factor VII sintético

<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 38

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

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

<210> 39
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 39

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

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

<210> 40
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 40

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

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

<210> 41
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 41

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

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

<210> 42
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 42

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

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

<210> 43
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 43

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

Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
20 25

<210> 44
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Ligando de afinidad al Factor VIII sintético

<400> 44

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

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

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Enlazador de inmovilización sintético para el terminal C del péptido

<400> 45

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Enlazador de inmovilización sintético para el terminal C del péptido

<400> 46

Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
1 5

Reivindicaciones

1. U polipéptido que se une a un Factor VIII o un fragmento de este que retiene actividad procoagulante del factor VIII, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe (sec. con núm. de ident.:5);
Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu (sec. con núm. de ident.:6);
Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (sec. con núm. de ident.:7);
Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His (sec. con núm. de ident.:8); y
Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (sec. con núm. de ident.:9).

2. Un polipéptido como se reivindica en la reivindicación 1 que se une al factor VIII o un fragmento de este que retiene propiedades procoagulantes del factor VIII, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGGSNHNH$_2$ (sec. con núm. de ident.:38);
AEGTGDFGCSWLFPCPFDPGPEGGGS-NHNH$_2$ (sec. con núm. de ident.:39); y
Acetil-AEGTGDRLCSWVSPCSADPEGGGSK (sec. con núm. de ident.:43).

3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que es capaz de unirse al factor VIII humano o un fragmento de este que retiene la actividad procoagulante del factor VIII cuando está en una solución que comprende: 100 mM NH_4 OAc, 0.8M NaCl, 1M sorbitol, 0.02% polioxietileno sorbitán monoaleato; 3 mM EDTA, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.3 y es capaz d disociarse a partir de dicho factor VIII humano o fragmento de este cuando está en una solución que contiene 50% etilenglicol.

4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, que se disocia a partir de dicho factor VIII o fragmento de este cuando se pone en contacto con una solución que comprende 50% de etilenglicol, 20 mM His, 0.25M NaCl, 20 mM $CaCl_2$, 0.01% de polioxietileno sorbitán monoaleato, pH 7.

5. Un método para detectar factor VIII o un fragmento de este que retiene las propiedades procoagulantes del factor VIII en una solución que comprende:

(a) poner en contacto dicha solución con un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y
(b) determinar si ocurre la unión entre dicho polipéptido y dicho factor VIII humano o fragmento de este.

6. Un método para purificar el factor VIII o un fragmento de este que retiene las propiedades procoagulantes del factor VIII que comprende:

(a) inmovilizar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en un soporte sólido;
(b) poner en contacto una solución que contiene dicho factor VIII humano o fragmento de este con dicho soporte; y, después de eso,
(c) separar la solución de dicho soporte.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe (sec. con núm. de ident.:5);
Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu (sec. con núm. de ident.:6);
Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (sec. con núm. de ident.:7);
Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His (sec. con núm. de ident.:8); y
Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (sec. con núm. de ident.:9).

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho polipéptido consiste de una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGGS-NHNH$_2$ (sec. con núm. de ident.:38);
AEGTGDFGCSWLFPCPFDPGPEGGGS-NHNH$_2$ (sec. con núm. de ident.:39); y
Acetil-AEGTGDRLCSWVSPCSADPEGGGSK (sec. con núm. de ident.:43).

9. Un medio de separación que comprende:

(a) un material de matriz cromatográfico, e, inmovilizado en este,
(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:
Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe (sec. con núm. de ident.:5);
Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu (sec. con núm. de ident.:6);
Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (sec. con núm. de ident.:7);
Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His (sec. con núm. de ident.:8); y
Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala (sec. con núm. de ident.:9).

10. Un medio de separación que consiste en el producto de reacción de:

(a) un material de matriz cromatográfico reactivo a amina, y
(b) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:
AEGTGDFHCIGVWFCLHDPGPEGGGS-$NHNH_2$ (sec. con núm. de ident.:38);
AEGTGDFGCSWLFPCPFDPGPEGGGS-$NHNH_2$ (sec. con núm. de ident.:39); y
Acetil-AEGTGDRLCSWVSPCSADPEGGGSK (sec. con núm. de ident.:43).

11. El medio de separación de la reivindicación 10, en donde dicho material de matriz es una resina cromatográfica de metacrilato aldehído-funcional.

12. El medio de separación de la reivindicación 11, en donde dicha resina es un soporte de copolímero de etilenglicol-metacrilato sustituido con formilo.

13. Un método para separar el factor VIII o un fragmento de este a partir de una solución que comprende:

(a) poner en contacto dicha solución con el medio de separación como se define en la reivindicación 9 bajo condiciones de unión,
(b) eliminar el material no unido, y
(c) eluir el factor VIII o fragmento de este unido a partir de dicho medio de separación.

14. Un método para purificar el factor VIII humano o fragmento de este que retiene las propiedades procoagulantes del factor VIII que comprende:

(a) poner en contacto una solución que contiene dicho factor VIII humano o fragmento de este con un soporte sólido que tiene un polipéptido de unión inmovilizado en el soporte, en donde el polipéptido de unión es un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
(b) separar la solución de dicho soporte, y
(c) obtener el polipéptido similar al factor VIII y/o factor VIII humano unido a partir del soporte.