

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 360**

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: **09155033 .5**

96 Fecha de presentación: **03.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **2090582**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Moléculas de unión para el factor VIII humano y proteínas similares al factor VIII humano**

30 Prioridad:
04.01.1999 US 224785

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
**DYAX CORP. (100.0%)
300 TECHNOLOGY SQUARE 8TH FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:
**YU, JINAN;
POTTER, DANIEL M.;
KELLEY, BRIAN D.;
DEETZ, JEFFREY S. y
BOOTH, JAMES E.**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 360 T3

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 el factor VIII humano y proteínas similares al factor VIII humano.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al 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 al factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII. Tales moléculas de unión son útiles para la detección y purificación del factor VIII y polipéptidos similares al factor VIII a partir de disoluciones que los contienen.

Antecedentes

- 10 La hemofilia A clásica es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X del factor VIII de coagulación del plasma sanguíneo, y afecta casi exclusivamente a varones, con una frecuencia de aproximadamente un caso por 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por portadores femeninos, que en sí mismos no tienen la enfermedad. El factor VIII es también conocido como factor antihemofílico (AHF, por sus siglas en inglés), factor hemofílico A, cofactor plaquetario, tromboplastinógeno, trombocitolisina, y globulina antihemofílica (AHG). La designación "factor VIII:C" se usa para indicar que es el compuesto que afecta a la coagulación. El factor VIII es una
- 15 proteína de alto peso molecular de 280 kDa y está compuesto de dos cadenas polipeptídicas de 200 kDa y 80 kDa respectivamente. Andersson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:2979-2973 (1986). Estas cadenas son mantenidas juntas por un puente de un ión metálico.

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

- Hasta estos últimos años, la principal fuente de factor VIII para fines terapéuticos era el plasma sanguíneo normal; sin embargo, el factor VIII aislado por este método, aunque de algún uso, tiene varias desventajas importantes. Por ejemplo, el factor VIII aislado a partir de plasma sanguíneo es bastante impuro, teniendo típicamente una actividad específica menor que 2 unidades de factor VIII/mg de proteína y un contenido global de factor VIII menor que 1%.
- 25 Adicionalmente, el procedimiento de purificación es caro, porque el material de partida, es decir, plasma humano, es caro. También se deben tomar muchas precauciones para disminuir el riesgo de transmisión de agentes infecciosos al paciente. Por ejemplo, comúnmente se detecta en la sangre donada el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la Hepatitis B, el virus de la Hepatitis C y otros agentes causantes de enfermedad. Otra desventaja de usar el factor VIII obtenido por este método es que aproximadamente una décima parte de los pacientes con
- 30 hemofilia A severa desarrollan anticuerpos contra el factor VIII, haciendo a la enfermedad difícil de tratar.

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

- Se han dado significativos pasos hacia la producción recombinante de factor VIII partiendo del aislamiento de fragmentos de factor VIII biológicamente activos. Véase, Andersson et al., patente de EE.UU. N° 4.749.780; Andersson et al., patente de EE.UU. N° 4.877.614. El gen que codifica la proteína del factor VIII humano de longitud
- 40 completa fue aislado aprovechando su homología de secuencia con el factor VIII porcino. Véase, Toole et al., patente de EE.UU. N° 4.757.006. Toole et al. también reportan la expresión de proteína humana y porcina que tiene actividad procoagulante de factor VIII:C.

- La solicitud de patente internacional WO 92/17192 describe una secuencia polipeptídica basada en un fragmento del factor von Willebrand (vWF) y la patente de EE.UU. N° 5.661.008 describe una secuencia de ADN para un derivado
- 45 del factor VIII humano.

- Sin embargo, aun existen efectos secundarios severos que implican la producción de anticuerpos anti-factor VIII con la administración de la proteína aislada a partir de fuentes tanto humanas como no humanas. También se sabe que los anticuerpos que reaccionan con el factor VIII:C humano reaccionan, hasta cierto punto, con factor VIII:C de otras especies, y el propio factor VIII porcino es antigénico en los seres humanos. También, los no hemofílicos pueden
- 50 desarrollar o contraer la enfermedad cuando sus sistemas inmunitarios se hacen sensibles al factor VIII:C.

- Como una posible solución a este problema, se ha diseñado una proteína truncada, de peso molecular más bajo, que exhibe actividad procoagulante. Véase, Toole, patente de EE.UU. N° 4.868.112. Toole reportó un método alternativo de tratamiento con factor VIII porcino de peso molecular más bajo de aproximadamente 2000 aminoácidos que exhibe una actividad procoagulante similar a la del factor VIII de longitud completa. Evidentemente,
- 55 la retirada de ciertos aminoácidos y hasta 19 de los 25 posibles sitios de glicosilación redujo la antigenicidad de la proteína, y de este modo la probabilidad de desarrollar anticuerpos anti-factor VIII. Sin embargo, una dificultad con el

desarrollo de factor VIII recombinante es conseguir niveles de producción en rendimientos suficientemente altos.

Recientemente, se han desarrollado moléculas de cDNA de factor VIII delecionadas que codifican derivados de factor VIII recombinante, que fueron proclives a dar rendimientos suficientemente altos de una proteína factor VIII recombinante biológicamente activa para uso en un proceso industrial para una preparación farmacéutica. Véase, Almstedt et al., patente de EE.UU. N° 5.661.008. Almstedt et al. diseñaron un factor VIII modificado derivado de un cDNA de factor VIII de longitud completa, que, cuando se expresó en células animales, produjo altos niveles de una proteína similar al factor VIII con actividad de factor VIII. La proteína consistió esencialmente en dos cadenas polipeptídicas derivadas del factor VIII humano, teniendo las cadenas pesos moleculares de 90 kDa y 80 kDa, respectivamente.

Según el procedimiento de Almstedt et al., los cDNAs de factor VIII se ensamblan en unidades de transcripción y se introducen en un sistema huésped adecuado para expresión. Las líneas celulares pueden ser cultivadas a gran escala en cultivo de suspensión o en soporte sólido. La proteína producida en el medio de cultivo es después concentrada y purificada. La proteína activa final está constituida por los aminoácidos 1 a 743 y 1638 hasta 2332 del factor VIII humano. Esta secuencia polipeptídica es conocida en el mercado como rFVIII-SQ o REFACTO®. Véase también, Lind et al., *Euro. J. Biochem.*, 232:19-27 (1995). También se pueden construir otras formas de FVIII truncado en las que el dominio B es generalmente delecionado. En tales realizaciones, los aminoácidos de la cadena pesada, que consiste esencialmente en los aminoácidos 1 hasta 740 del Factor VIII humano y que tiene un peso molecular de aproximadamente 90 kD, están conectados 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 pesada y ligera pueden estar conectadas por un péptido enlazador de 2 a 15 aminoácidos, por ejemplo un enlazador que comprende residuos de lisina o arginina, o alternativamente, enlazadas por un enlace de ión metálico.

Actualmente, hay una necesidad en este campo de métodos eficaces y rentables para obtener factor VIII activo, purificado, directamente a partir de diversas soluciones tales como sangre o sobrenadantes de cultivos celulares.

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

Compendio de la invención

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevas moléculas de unión para el factor VIII y proteínas similares al factor VIII. Las moléculas de unión preferidas de la presente invención exhiben no sólo claras características para la unión de los polipéptidos del factor VIII diana sino también específicas y deseables características para la liberación (elución) de los polipéptidos diana. Las moléculas de unión especialmente preferidas según la invención son secuencias polipeptídicas cortas, caracterizadas por una estructura en bucle estable.

Se describe en la presente memoria un método preferido para el aislamiento de moléculas de unión acordes con la invención empleando tecnología de presentación en fagos. El método de presentación en fagos de la presente invención es útil para identificar familias de moléculas de unión a polipéptidos, y usando esta técnica se han identificado y aislado varios péptidos de unión que exhiben alta afinidad por el factor VIII y péptidos similares al factor VIII. Tales péptidos de unión son útiles para identificar, aislar y purificar factor VIII y polipéptidos similares al factor VIII a partir de una solución.

Las moléculas de unión más preferidas específicas para el factor VIII y péptidos similares al factor VIII aisladas por el método de presentación en fagos de la presente invención son polipéptidos caracterizados por una estructura en bucle formada como resultado de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína situados en las posiciones descritas en la SEQ ID NO: 3. Las moléculas de unión a polipéptidos específicas acordes con la presente invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos de la siguiente fórmula general:

Phe-Cys-X₁₈-Val-X₁₉-X₂₀-Phe-X₂₁-His-Cys-X₂₂ (SEQ ID NO: 3),

en donde X₁₈ es His o Trp; X₁₉ es His o Phe; X₂₀ es Ala, Asn, His o Pro; X₂₁ es Ala, Asn, Asp, Gln, His, Leu, Ser, o Val; X₂₂ es Ala, Asp, His, Leu, Phe o Ser.

Además, también está previsto que el método de presentación en fagos de la presente invención también se pueda usar para aislar familias adicionales de moléculas de unión específicas para el factor VIII y polipéptidos similares al factor VIII.

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

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His (SEQ ID NO: 22);

Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala-His-Cys-Leu (SEQ ID NO: 23);

Phe-Cys-His-Val-Phe-His-Phe-Ser-His-Cys-Asp (SEQ ID NO: 24);

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His (SEQ ID NO: 25);

5 Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Asn-Phe-Ser-His-Cys-Ser (SEQ ID NO: 26);

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Asp (SEQ ID NO: 27);

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Ser (SEQ ID NO: 28);

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Gln-His-Cys-Ala (SEQ ID NO: 29);

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-His-His-Cys-Phe (SEQ ID NO: 30);

10 Phe-Cys-His-Val-Phe-Asn-Phe-Val-His-Cys-Ser (SEQ ID NO: 31);

Phe-Cys-His-Val-Phe-Pro-Phe-Leu-His-Cys-Asp (SEQ ID NO: 32);

Las soluciones a partir de las que se puede aislar y purificar factor VIII y polipéptidos similares al factor VIII incluyen, pero no se limitan a, sangre, fracciones de la sangre, y sobrenadantes de cultivos celulares recombinantes que contienen factor VIII o un polipéptido similar al factor VIII producido y secretado por la célula huésped recombinante.

15 La presente invención se refiere a un método para identificar y aislar moléculas de unión al factor VIII por medio de tecnología de presentación en fagos. Más específicamente, las moléculas de unión al factor VIII y péptidos similares al factor VIII que tienen características de unión y elución específicas y predeterminadas se pueden seleccionar de una librería de moléculas de unión, tal como una librería de presentación en fagos, mediante un método que comprende:

20 (a) seleccionar una primera condición de solución (es decir, las condiciones de unión) en la que se desea que una molécula de unión exhiba una afinidad por el factor VIII o un polipéptido similar al factor VIII, formando un complejo de afinidad;

(b) seleccionar una segunda condición de solución (es decir, las condiciones de liberación) en la que se desea que la molécula de unión se disocie del factor VIII o el polipéptido similar al factor VIII, en donde la segunda condición de solución es diferente en algún aspecto (p.ej., temperatura, pH, concentración de disolvente, etc.) de la primera condición de solución;

25 (c) proporcionar una librería de análogos de un dominio de unión al factor VIII parental, en donde cada análogo difiere de dicho dominio de unión parental por variación de la secuencia de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácido dentro del dominio;

30 (d) poner en contacto dicha librería de análogos con factor VIII o un polipéptido similar al factor VIII en la primera condición de solución bajo condiciones adecuadas para formar un complejo entre la molécula de unión y el factor VIII o polipéptido similar al factor VIII;

(e) retirar de la solución los miembros no unidos (análogos) de la librería del dominio de unión;

35 (f) someter los complejos del factor VIII o polipéptido similar al factor VIII que quedan de la etapa (e) a la segunda condición de solución para la disociación de algunos de los complejos molécula de unión/factor VIII (o polipéptido similar al factor VIII);

(g) recuperar los análogos de unión liberados bajo la segunda condición de solución, en donde los análogos recuperados identifican moléculas de unión al factor VIII o similar al factor VIII aisladas.

40 Opcionalmente, el procedimiento anterior puede incluir etapas de condiciones de liberación adicionales, es decir, someter opcionalmente los complejos de factor VIII o polipéptido similar al factor VIII que quedan de la etapa (f) a una tercera condición de solución para disociar otros complejos remanentes, que pueden ser recogidos en una fracción independiente de las moléculas de unión al factor VIII liberadas bajo las segundas condiciones de solución. Tal etapa, si las condiciones son lo suficientemente rigurosas para disociar todos los complejos formados en la etapa (d), identificará las condiciones de solución adecuadas para la regeneración de las matrices de unión que utilizan las

45 moléculas de unión aisladas según este procedimiento.

La presente invención también se refiere a moléculas de unión no peptídicas y polipéptidos modificados que se unen al factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII. Un ejemplo de estas modificaciones es un péptido en bucle constreñido que tiene residuos de cisteína emparejados que forman enlaces disulfuro, modificado en los residuos de cisteína por 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 cíclico de péptidos sintéticos se describen en la publicación PCT WO 97/46251, incorporada en la presente memoria por referencia. Otras modificaciones contempladas específicamente incluyen sustituciones de aminoácidos específicas para dar estabilidad u otras propiedades sin afectar significativamente a la unión al factor VIII, p.ej., la sustitución de Glu-Pro por Asp-Pro para reducir la labilidad en ácidos; modificaciones N-terminales o C-terminales para incorporar enlazadores tales como segmentos de poli-glicina y alteraciones para incluir grupos funcionales, notablemente funcionalidades hidrazida (-NH-NH₂), p.ej., para ayudar a la inmovilización de los polipéptidos de unión acordes con esta invención sobre soportes sólidos.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende ácidos nucleicos aislados, preferiblemente ADN, que codifican moléculas de unión de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar un factor VIII o un péptido similar al factor VIII en una solución sospechosa de contenerlo, que comprende poner en contacto la solución con una molécula de unión acorde con la presente invención y determinar si se ha formado un complejo de unión.

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

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

Definiciones

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "recombinante" se usa para describir ácidos nucleicos alterados o manipulados no naturalmente, células huésped transfectadas con ácidos nucleicos exógenos, o polipéptidos expresados no naturalmente, mediante la manipulación de ADN aislado y transformación de células huésped. Recombinante es un término que abarca específicamente moléculas de ADN que han sido construidas *in vitro* usando técnicas de ingeniería genética, y el uso del término "recombinante" como adjetivo para describir una molécula, construcción, vector, célula, polipéptido o polinucleótido excluye específicamente tales moléculas, construcciones, vectores, células, polipéptidos o polinucleótidos existentes en la naturaleza.

El término "bacteriófago" se define como un virus bacteriano que contiene un núcleo de ADN y una corteza protectora construida por la agregación de varias moléculas proteicas diferentes. Los términos "bacteriófago" y "fago" se usan en la presente memoria de manera intercambiable.

El término "polipéptido similar al factor VIII" se usa para hacer referencia a una forma modificada o trunca de factor VIII natural o factor VIII recombinante de longitud completa, en donde el polipéptido similar al factor VIII conserva las propiedades procoagulantes del factor VIII. Ejemplos de polipéptidos similares al factor VIII son los fragmentos de factor VIII activos y derivados del factor VIII descritos en las patentes de Andersson et al., Toole, y Almstedt et al. citadas anteriormente, todas las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia. El término "factor VIII diana" se usa a veces más adelante para hacer referencia colectivamente al factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII contenidos en una solución o corriente de alimentación de producción.

El término "molécula de unión", tal como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier molécula, polipéptido, peptidomimético o células 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. Ejemplos específicos de moléculas de unión al factor VIII son los polipéptidos descritos en la presente memoria (p.ej., SEQ ID NOs: 1-32) y la presentación en fagos de cualquiera de tales polipéptidos. También se incluyen dentro de la definición de moléculas de unión al factor VIII polipéptidos derivados de o que incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos acorde con la fórmula anterior, y tales polipéptidos que han sido modificados para resultados particulares. Los ejemplos específicos de modificaciones contempladas son sustituciones de aminoácidos C-terminales o N-terminales o elongaciones de cadenas polipeptídicas a fin de enlazar el resto de unión a un soporte cromatográfico u otro sustrato, y sustituciones de pares de residuos de cisteína que forman normalmente enlaces disulfuro, por ejemplo por residuos de aminoácidos no existentes en la naturaleza que tienen cadenas laterales reactivas, a fin de formar una unión más estable entre esas posiciones de aminoácido que el enlace disulfuro antiguo. Todas las tales moléculas de unión modificadas están consideradas también moléculas de unión según esta invención, siempre y cuando conserven la capacidad de unirse al factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

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

- 5 El factor VIII y/o péptidos similares al factor VIII se pueden producir de cualquier manera conocida, incluyendo síntesis química; producción en células huésped transformadas; secreción en medio de cultivo por células existentes en la naturaleza o bacterias, levaduras, hongos, células de insectos y células de mamíferos transformadas de manera recombinante; secreción de organismos manipulados genéticamente (p.ej., mamíferos transgénicos); o en fluidos o tejidos biológicos tales como sangre, plasma, etc. La solución que contiene el factor VIII bruto como es producido inicialmente (es decir, la solución de producción) se denominará a veces la "corriente de alimentación".
- 10 Cada método de producción del factor VIII (o un polipéptido similar al factor VIII) proporciona factor VIII en una corriente de alimentación que contiene adicionalmente varias impurezas (con respecto al factor VIII). Un propósito de la presente invención es producir ligandos de afinidad y preparaciones (tales como medios de cromatografía) que comprenden tales ligandos, que permiten la rápida y altamente específica purificación de factor VIII a partir de una corriente de alimentación particular. Los ligandos de afinidad del factor VIII obtenidos en la presente memoria
- 15 pueden ser adaptados para el aislamiento de factor VIII a partir de una corriente de alimentación particular, bajo condiciones preseleccionadas específicas. Si se usa un método de producción alternativo para el factor VIII, que produce una corriente de alimentación diferente, puede ser necesario un conjunto diferente de ligandos de afinidad para conseguir el mismo nivel de purificación. El nuevo conjunto de ligandos se puede obtener fácilmente siguiendo los procedimientos bosquejados en la presente memoria.
- 20 Las moléculas de unión al factor VIII de la invención se unen al factor VIII con alta afinidad, comparable a o superior a otras proteínas, tales como anticuerpos conocidos por unirse al factor VIII. Además, los ligandos de afinidad preferidos descritos en la presente memoria liberan el factor VIII intacto y en forma activa bajo condiciones de liberación específicas.

Selección de condiciones de unión y liberación

- 25 Se aislaron moléculas de unión a polipéptidos acordes con la presente invención usando tecnología de presentación a fagos, de una manera que identifica péptidos de unión al factor VIII que exhiben propiedades particulares preseleccionadas de unión y liberación. 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 conjunto de condiciones de solución bajo las que se desea que un polipéptido de unión descubierto se una al factor VIII diana (o
- 30 polipéptido similar al factor VIII); las condiciones de liberación son un conjunto de condiciones de solución bajo las que se desea que un polipéptido de unión descubierto no se una al factor VIII (es decir, se disocie del factor VIII). Las dos condiciones se pueden seleccionar para satisfacer cualquier criterio del profesional, tal como facilidad de alcanzar las condiciones, compatibilidad con otras etapas de purificación, coste disminuido del cambio entre condiciones comparado con otros medios de afinidad, etc. Preferiblemente, las dos condiciones de solución se
- 35 seleccionan para no afectar de manera adversa a la estabilidad o actividad de la proteína diana (factor VIII o péptido similar al factor VIII) y para diferir significativamente con respecto al menos a un parámetro de solución. Por ejemplo, al realizar el cribado para péptidos de unión adecuados descritos en la presente memoria, se seleccionaron ligantes que se disociaban de la diana en presencia de un tampón que contenía etilenglicol, o condiciones de pH disminuido (es decir, pH 2), o combinaciones de esas condiciones, que diferían de las condiciones empleadas para la unión.
- 40 Otro parámetro que podría ser variado ventajosamente es la concentración de una sal, por ejemplo NaCl, en los tampones de unión y elución.

Selección de un dominio de unión parental

- Junto 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
- 45 manipuladas que exhibirán las capacidades de unión y liberación deseadas. El dominio de unión puede ser una proteína existente en la naturaleza o sintética, 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 esto no es crítico. De hecho, no es esencial que el dominio de unión parental tenga alguna afinidad por el factor VIII en absoluto: su propósito es proporcionar una estructura a partir de la cual se pueda generar una
- 50 multiplicidad de análogos (una "librería"), multiplicidad de análogos que incluirá uno o más análogos que exhiban las propiedades de unión y liberación deseadas (y cualesquiera otras propiedades para las que se seleccionan). Las condiciones de unión y las condiciones de liberación discutidas antes 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 que pertenece el dominio de unión parental, o independientemente por completo de la elección del dominio de unión parental. De manera similar, las condiciones de unión y/o liberación se pueden seleccionar con respecto a interacciones conocidas entre un dominio de unión y el factor VIII, p.ej., para favorecer la interacción bajo
- 55 una o ambas de las condiciones de solución, o se pueden seleccionar sin tener en cuenta tales interacciones conocidas. Asimismo, el dominio de unión parental se puede seleccionar teniendo en cuenta las condiciones de unión y/o liberación o no, aunque debe ser reconocido 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 serán ensayados frente a la molécula del factor VIII. Al seleccionar el dominio de unión parental, la consideración más importante es cómo serán presentados los dominios de los análogos al factor VIII, es decir, en qué conformación el factor VIII y los análogos entrarán en contacto. En realizaciones preferidas, por ejemplo, los análogos serán generados por inserción de ADN sintético que codifica el análogo en un paquete genético replicable, dando como resultado la presentación del dominio sobre la superficie de un microorganismo, tal como el fago M13, usando técnicas como las que se describen, p.ej., en Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins: A laboratory Manual, (Academic Press, Inc.; San Diego 1996) y la patente de EE.UU. N° 5.223.409 (Ladner et al.).

Para la formación de librerías de presentación en fagos, se prefiere usar polipéptidos estructurados como dominio de unión plantilla, en lugar de péptidos lineales, no estructurados. La mutación de residuos superficiales en una proteína tendrá usualmente poco efecto sobre la estructura global o las propiedades generales (tales como tamaño, estabilidad y temperatura de desnaturalización) de la proteína; mientras que, al mismo tiempo, la mutación de residuos superficiales puede afectar profundamente a las propiedades de unión de la proteína. Cuanto más fuertemente está constreñido un segmento peptídico, menos probable es que se una a alguna diana particular. Si sí se une, sin embargo, la unión es proclive a ser más fuerte y más específica. Por tanto, se prefiere seleccionar un dominio de unión parental y, a su vez, una estructura para los análogos polipeptídicos, que esté constreñida dentro de un almacén que tenga algún grado de rigidez.

Preferiblemente, el dominio proteico que se usa como plantilla o dominio parental para generar la librería de análogos de dominio será una proteína o polipéptido pequeños. Las proteínas o polipéptidos pequeños ofrecen varias ventajas sobre las proteínas grandes: en primer lugar, la masa por sitio de unión es reducida. Dominios proteicos altamente estables que tienen bajos pesos moleculares, p.ej., dominios Kunitz (~7 kDa), dominios Kazal (~7 kDa), dominios de inhibidor de tripsina de *Cucurbita maxima* (CMTI) (~3,5 kDa), y endotelina (~2 kDa), pueden mostrar una unión mucho más alta por gramo que la de los anticuerpos (150 kDa) o anticuerpos de cadena única (30 kDa). En segundo lugar, la posibilidad de unión no específica se reduce, porque hay menos superficie disponible. En tercer lugar, las proteínas o polipéptidos pequeños pueden ser manipulados para que tengan sitios de ligadura únicos de una manera que es impracticable para proteínas o anticuerpos más grandes. Por ejemplo, se pueden manipular proteínas pequeñas para que tengan lisinas sólo en sitios adecuados para la ligadura (p.ej., a una matriz de cromatografía), pero esto no es factible para anticuerpos. En cuarto lugar, una estructura polipeptídica constreñida es más proclive a retener su funcionalidad cuando es transferida con el dominio estructural intacto desde un almacén a otro. Por ejemplo, la estructura del dominio de unión es proclive a ser transferible desde el almacén usado para la presentación en una librería (p.ej., presentado en un fago) a una proteína aislada retirada del almacén de presentación o inmovilizada sobre un sustrato cromatográfico.

La inmovilización de los polipéptidos acordes con la invención está contemplada, p.ej., sobre matrices cromatográficas para formar medios de separación del factor VIII eficaces para soluciones tales como sangre entera o medios de cultivo acondicionados que contienen factor VIII secretado desde una célula huésped transformante. Seleccionando plantillas de dominios de unión apropiadas, se pueden aislar polipéptidos de unión que tienen una única cisteína libre (no emparejada con otra cisteína que forma habitualmente un enlace disulfuro). Tales polipéptidos tiol-funcionales se pueden usar para una inmovilización altamente estable a sustratos por formación de un tioéter con yodoacetamida, ácido yodoacético, o grupos ácido α -yodocarboxílico similares.

De modo similar, el grupo carboxilo C-terminal del dominio polipeptídico puede ser convertido en una hidrazida (-NH-NH₂), para reacción con un sustrato aldehído-funcional u otro sustrato reactivo con amina. Se prefiere esta técnica.

Hay muchos dominios proteicos estables, pequeños, adecuados para uso como dominios de unión parentales y para los que 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 intervalo de pH, temperatura, salinidad, disolvente orgánico, concentración de oxidantes. Algunos ejemplos son: dominios de Kunitz (58 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios de inhibidor de tripsina de *Cucurbita maxima* (31 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios relacionados con guanilina (14 aminoácidos, 2 enlaces disulfuro), dominios relacionados con enterotoxina IA estable al calor de bacterias gram negativas (18 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios EGF (50 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios kringle (60 aminoácidos, 3 enlaces disulfuro), dominios de unión a carbohidratos fúngicos (35 aminoácidos, 2 enlaces disulfuro), dominios de endotelina (18 aminoácidos, 2 enlaces disulfuro), y dominio de unión a IgG de *Streptococcus G* (35 aminoácidos, sin enlaces disulfuro). La mayoría, pero no todos estos contienen enlaces disulfuro que mantienen y estabilizan la estructura. El dominio de unión parental también puede estar basado en un bucle único (un disulfuro) de una microproteína que es homóloga a un dominio proteico conocido o no. Por ejemplo, se usaron bucles constreñidos de 7 a 9 aminoácidos para formar librerías para aislar moléculas de unión al factor VIII y polipéptidos similares al factor VIII, como se describe más adelante. Las librerías basadas en estos dominios, preferiblemente presentados en fago, pueden ser construidas y usadas fácilmente para la selección de moléculas de unión acordes con esta invención.

Proporcionar una librería de análogos de dominios de unión parentales

Una vez que se ha seleccionado un dominio de unión parental, se crea una librería de moléculas de unión potenciales para el cribado frente una diana, en este caso factor VIII y/o proteínas similares al factor VIII, bajo las condiciones de unión deseadas y (opcionalmente) las condiciones de elución (liberación) deseadas. La librería se crea preparando una serie de análogos, correspondiendo cada análogo 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 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 aminoácido que se seleccionan para variación (posiciones de aminoácido variables) sean posiciones de aminoácido superficiales, esto es, posiciones en la secuencia de aminoácidos de los dominios que, cuando el dominio está en su conformación más estable, aparecen en la superficie exterior del dominio (es decir, la superficie expuesta a la solución). Lo más preferiblemente, las posiciones de aminoácido a ser variadas serán adyacentes o cercanas entre sí, para maximizar el efecto de las sustituciones. Además, se pueden añadir aminoácidos extra en la estructura del dominio de unión parental. En realizaciones preferidas, especialmente donde está disponible una gran cantidad de información referente a las interacciones del factor VIII con otras moléculas, particularmente el dominio de unión parental, las posiciones de aminoácido que son esenciales para interacciones de unión serán determinadas y conservadas en el proceso de construcción de la librería de análogos (es decir, los aminoácidos esenciales para la unión no serán variados).

El objeto de crear la librería de análogos es proporcionar un número muy grande de moléculas de unión potenciales para reacción con la molécula del factor VIII, y en general cuanto mayor es el número de análogos en la librería, mayor es la probabilidad de que al menos un miembro de la librería se una al factor VIII y se libere bajo condiciones preseleccionadas o deseables para liberación. Las librerías diseñadas siguiendo una estructura plantilla particular y limitando la variación de aminoácidos en posiciones particulares son muy preferidas, dado que una única librería puede abarcar todos los análogos diseñados y las secuencias incluidas serán conocidas y presentadas en números aproximadamente iguales. En contraste, la sustitución aleatoria en sólo seis posiciones en una secuencia de aminoácidos proporciona más de 60 millones de análogos, que es un tamaño de librería que empieza a presentar limitaciones prácticas incluso cuando se utilizan técnicas de cribado tan poderosas como la presentación en fagos. Librerías más grandes que esta plantearían problemas de manejo, p.ej., se necesitaría que los recipientes de fermentación fueran de tamaño extraordinario, y, de manera más importante, la probabilidad de tener todas las variaciones de secuencias polipeptídicas planeadas representadas en la librería preparada disminuirían bruscamente. Se prefiere por lo tanto crear una librería diseñada o sesgada, en la que las posiciones de aminoácido designadas para variación son consideradas de tal modo que maximicen el efecto de sustitución sobre las características de unión del análogo, y los residuos de aminoácidos permitidos o planeados para uso en sustituciones son limitados, p.ej., en base a que sean proclives a causar que el análogo se una bajo las condiciones de solución a las que la librería será cribada para ligantes.

Como se indicó previamente, las técnicas discutidas en Kay et al., anteriormente, y Ladner et al., patente de EE.UU. 5.223.409, son particularmente útiles en la preparación de una librería de análogos correspondiente a un dominio de unión parental seleccionado, análogos que serán presentados en una forma adecuada para el cribado a gran escala de grandes números de análogos con respecto a una molécula de factor VIII diana. El uso de paquetes genéticos replicables, y lo más preferiblemente bacteriófagos, es un método poderoso para generar nuevas entidades de unión polipeptídicas que implica introducir un segmento de ADN exógeno, nuevo, en el genoma de un bacteriófago (u otro paquete genético amplificable) de tal modo que el polipéptido codificado por el ADN no nativo aparezca en la superficie del fago. Cuando el ADN insertado contiene diversidad de secuencias, entonces cada fago receptor presenta una variante de la secuencia de aminoácidos plantilla (parental) codificada por el ADN, y la población de fagos (librería) presenta un vasto número de secuencias de aminoácidos diferentes pero relacionadas.

En un procedimiento de cribado para obtener ligantes del factor VIII según esta invención, una librería de fagos se pone en contacto con y se deja unir a una molécula de factor VIII diana, usualmente inmovilizada en un soporte sólido. Los no ligantes se separan de los ligantes. En diversas maneras, los fagos unidos son liberados del factor VIII, recogidos y amplificados. Dado que los fagos pueden ser amplificados mediante infección de células bacterianas, incluso unos pocos fagos de unión son suficientes para revelar la secuencia de genes que codifica una entidad de unión. Usando estas técnicas es posible recuperar un fago de unión que es aproximadamente 1 en 20 millones en la población. Una o más librerías, que presentan 10-20 millones o más de polipéptidos de unión cada una, pueden ser cribadas rápidamente para encontrar ligantes del factor VIII de alta afinidad. Cuando el proceso de selección trabaja, la diversidad de la población cae con cada ronda hasta que sólo quedan ligantes buenos, es decir, el proceso converge. Típicamente, una librería de presentación de fagos contendrá varios ligantes estrechamente relacionados (10 a 50 ligantes de 10 millones). Las indicaciones de convergencia incluyen unión aumentada (medida por concentraciones de fagos) y recuperación de secuencias estrechamente relacionadas. Después de que se identifica un primer conjunto de péptidos de unión, la información de secuencia se puede usar para diseñar otras librerías sesgadas para miembros que tienen propiedades adicionales deseadas, p.ej., discriminación entre factor VIII y fragmentos particulares o impurezas estrechamente relacionadas en una corriente de alimentación particular.

Tales técnicas hacen posible no sólo cribar un gran número de moléculas de unión potenciales sino que hacen práctico repetir los ciclos de unión/elución y construir librerías sesgadas secundarias para cribar paquetes de

presentación de análogos que cumplan criterios iniciales. Usando estas técnicas, se puede cribar una librería sesgada a análogos para revelar miembros que se unen fuertemente (es decir, con alta afinidad) bajo las condiciones de cribado.

Síntesis de análogos polipeptídicos

5 Siguiendo los procedimientos bosquejados anteriormente, se pueden aislar moléculas de unión adicionales para el factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII a partir de las librerías de presentación en fagos descritas en la presente memoria u otras librerías o colecciones de presentación en fagos de moléculas de unión potenciales (p.ej., librerías combinatorias de compuestos orgánicos, librerías de péptidos aleatorios, etc.). Una vez aisladas, la secuencia de cualquier péptido de unión individual o la estructura de cualquier molécula de unión puede ser
10 analizada, y el ligante se puede producir en cualquier cantidad deseada usando métodos conocidos. Por ejemplo, las moléculas polipeptídicas de unión descritas en la presente memoria, dado que sus secuencias son ahora conocidas, se pueden producir ventajosamente por síntesis química seguido de tratamiento bajo condiciones oxidantes apropiadas para obtener la conformación nativa, es decir, los enlaces de disulfuro correctos. La síntesis se puede llevar a cabo por 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, págs. 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 pueden preparar bien por síntesis química o bien por semisíntesis. Los métodos de síntesis
15 química o semisíntesis permiten la posibilidad de incorporar residuos de aminoácidos no naturales.

Las moléculas de unión a polipéptidos de la presente invención se preparan preferiblemente usando síntesis de
20 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 empieza en el término carboxi del polipéptido putativo acoplando un aminoácido protegido a una resina adecuada, que reacciona con el grupo carboxi del aminoácido C-terminal para formar una unión que es escindida fácilmente después, tal como una resina de halometilo, p.ej., resina de
25 clorometilo y resina de bromometilo, resina de hidroximetilo, resina de aminometilo, resina de benzhidrilamina, o resina de t-alquiloiloxycarbonil-hidrazida. Después de la retirada del grupo protector de α -amino con, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno y neutralización en, por ejemplo, TEA, el siguiente ciclo en la síntesis es fácil de llevar a cabo. Los restantes aminoácidos protegidos en α -amino, y, si es necesario, en cadena lateral, son después acoplados secuencialmente en el orden deseado por condensación para obtener un compuesto intermedio conectado a la resina. Alternativamente, algunos aminoácidos pueden ser acoplados unos a otros formando un
30 oligopéptido antes de la adición del oligopéptido a la cadena polipeptídica creciente en la fase sólida.

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 la azida, el método del anhídrido de ácido mixto, el método DCC (diciclohexilcarbodiimida), el método del éster activo (método del éster de p-nitrofenilo, el método BOP [hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio], el método del éster imido del
35 ácido N-hidroxisuccínico), y el método del reactivo K de Woodward.

Es común en la síntesis química de péptidos la protección de los grupos laterales reactivos de los diversos restos de aminoácidos con grupos protectores adecuados en ese sitio hasta que el grupo es retirado al final después de que la cadena ha sido ensamblada completamente. También es común la protección del grupo α -amino en un aminoácido o un fragmento mientras esa entidad reacciona en el grupo carboxilo, seguido de la retirada selectiva del grupo
40 protector del α -amino para permitir que la reacción posterior tenga lugar en esa ubicación. Por consiguiente, es común que, como etapa en la síntesis, se produzca un compuesto intermedio que incluye cada uno de los residuos de aminoácido situados en la secuencia deseada en la cadena polipeptídica, teniendo diversos de estos residuos grupos protectores de cadenas laterales. Después, estos grupos protectores son comúnmente retirados sustancialmente al mismo tiempo para producir el producto resultante deseado después de la purificación.

Los grupos protectores típicos para proteger los grupos de cadena lateral α - y ϵ -amino están ejemplificados por benciloxycarbonilo (Z), isonicotiniloxycarbonilo (iNOC), O-clorobenciloxycarbonilo [Z(NO₂)], p-metoxibenciloxycarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxycarbonilo (Aoc), isoborniloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo, 2-(4-bifenil)-2-propiloxycarbonilo (Bpoc), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), metilsulfoniletoxycarbonilo (Msc), trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo (NPS), difenilfosfotioilo (Ppt), dimetilofosfotioilo (Mpt), y similares.

Como grupos protectores para el grupo carboxi se pueden poner como ejemplos, por ejemplo, éster bencilico (OBzl), éster ciclohexílico (Chx), éster 4-nitrobencilico (ONb), éster t-butilico (Obut), éster 4-piridilmetílico (OPic), y similares. Es deseable que aminoácidos específicos tales como arginina, cisteína y serina, que poseen un grupo funcional distinto a los grupos amino y carboxilo, sean protegidos por un grupo protector adecuado según demande la
50 ocasión. Por ejemplo, el grupo guanidino en la arginina puede ser protegido con nitro, p-toluenosulfonilo, benciloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo, p-metoxibencenosulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbencenosulfonilo (Mds), 1,3,5-trimetilfenilsulfonilo (Mts), y similares. El grupo tiol en la cisteína puede ser protegido con p-metoxibencilo, trifenilmetilo, acetilaminometilcarbamilo, 4-metilbencilo, 2,4,6-trimetilbencilo (Tmb), etc., y el grupo hidroxilo en la serina puede ser protegido con bencilo, t-butilo, acetilo, tetrahidropirano, etc.

Después de que se ha completado la secuencia de aminoácidos deseada, el polipéptido intermedio es retirado del

soporte de resina por tratamiento con un reactivo, tal como HF líquido y uno o más depuradores que contienen el grupo tio, que no sólo escinde el polipéptido de la resina, sino también escinde todos los grupos protectores de cadena lateral remanentes. Después de la escisión con HF, la secuencia de proteína se lava con éter, se transfiere a un gran volumen de ácido acético diluido, y se agita 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 acordes con la invención también se pueden preparar comercialmente por compañías que proporcionan síntesis de polipéptidos como servicio (p.ej., BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA).

Uso de las moléculas de unión en detección o purificación

Para la detección del factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII en una solución tal como sangre o medios acondicionados sospechosos de contenerlo, una molécula de unión acorde con la invención puede ser marcada de manera detectable, p.ej., radiomarcada o marcada enzimáticamente, después ser puesta en contacto con la solución, y después de esto la formación de un complejo entre la molécula de unión y el factor VIII diana puede ser detectada. Una molécula de unión en fagos acorde con la invención, es decir, un fago recombinante que presenta un polipéptido ligante con el factor VIII en su superficie, puede formar un complejo con el factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII que es detectable como sedimento en un tubo de reacción, que puede ser detectado visualmente después de sedimentación o centrifugación.

Alternativamente, se puede usar un ensayo de tipo sandwich, en el que una molécula de unión al factor VIII está inmovilizada en un soporte sólido tal como un tubo de plástico o pocillo, o una matriz cromatográfica tal como perlas de sefrosa, después la solución sospechosa de contener el factor VIII diana se pone en contacto con la molécula de unión inmovilizada, los materiales no unidos se retiran por lavado, y el factor VIII o polipéptido similar al factor VIII complejoado es detectado usando un reactivo de detección adecuado, tal como un anticuerpo monoclonal que reconoce el factor VIII diana, reactivo que es detectable por algún medio convencional conocido en la técnica, incluyendo los que están marcados de manera detectable, p.ej., radiomarcados o marcados enzimáticamente, como con peroxidasa de rábano picante, y similares.

Las moléculas de unión acordes con esta invención serán extremadamente útiles para el aislamiento de factor VIII y/o polipéptidos similares al factor VIII por métodos de cromatografía de afinidad. Se puede emplear cualquier método convencional de cromatografía. Preferiblemente, un ligando de afinidad de la invención será inmovilizado en un soporte sólido adecuado, p.ej., para rellenar una columna cromatográfica. El ligando de afinidad inmovilizado puede ser cargado o puesto en contacto después con una corriente de alimentación bajo condiciones favorables a la formación de complejos molécula de unión/factor VIII (o polipéptido similar al factor VIII). Los materiales que no se unen se pueden retirar por lavado, después el factor VIII (o polipéptido similar al factor VIII) puede ser eluido introduciendo condiciones de solución que favorecen la disociación del complejo de unión.

Alternativamente, se puede llevar a cabo una cromatografía discontinua mezclando una solución que contiene el factor VIII diana y la molécula de unión, aislando después los 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 ser inmovilizada en un soporte sólido, y separada después de la corriente de alimentación junto con el factor VIII diana por filtración. O la molécula de unión puede ser modificada con su propia etiqueta de afinidad, tal como una cola de poliHis, que se puede usar para unir el ligante después de que se han formado los complejos usando una cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. Una vez separado, el factor VIII diana puede ser liberado de la molécula de unión bajo condiciones de elución y recuperado en forma pura.

Se debe advertir que aunque se preseleccionaron condiciones de unión precisas al obtener los polipéptidos que se unen al factor VIII descritos en la presente memoria, el uso posterior en purificación por afinidad puede revelar condiciones de unión y liberación más óptimas bajo las que funcionará el mismo ligando de afinidad aislado. Por tanto, no es crítico que la molécula de unión, después del aislamiento según esta invención, se emplee siempre sólo en las condiciones de unión y liberación que conduzcan a su separación de la librería.

El aislamiento de moléculas que se unen al factor VIII de acuerdo con esta invención se ilustrará adicionalmente a continuación. Los parámetros específicos incluidos en los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la práctica de la invención, y de ninguna manera se presentan para limitar el alcance de la invención.

Ejemplo I: Aislamiento de moléculas de unión para un polipéptido similar al factor VIII

Las técnicas descritas anteriormente se emplearon para aislar moléculas de unión de alta afinidad por ligandos para un polipéptido similar al factor VIII producido de manera recombinante que consiste en dos segmentos del factor VIII humano, es decir, los aminoácidos 1-743 y 1638 hasta 2332 del factor VIII humano, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.661.008 (Almstedt et al.), obtenido bajo la designación comercial de REFACTO® en Genetics Institute, Inc (Cambridge, MA). El REFACTO® diana fue proporcionado a una concentración de aproximadamente 530 µg/ml (7800 IU/ml) en His 19,4 mM, NaCl 300 mM, CaCl₂ 3,4 mM y Tween 80 al 0,1%, pH 7,0.

Se construyeron tres librerías, designadas como TN7 (5×10^9 de diversidad de secuencia de aminoácidos), TN8 ($6 \times$

10⁹ de diversidad de secuencia de aminoácidos) y TN9 (5 x 10⁹ de diversidad de secuencia de aminoácidos) para la expresión de polipéptidos diversificados en fagos M13. Cada librería fue cribada para ligantes a REFECTO® purificado. Cada una de las librerías se construyó para presentar un microproteína basada en una plantilla de 11 o 12 aminoácidos. La librería TN7 utilizó una secuencia plantilla de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 33); la librería TN8 utilizó una secuencia plantilla de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 34); la librería TN9 utilizó una secuencia plantilla de Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 35).

Se llevaron a cabo tres rondas de cribados para cada librería. A la conclusión de la tercera ronda de cribados se propagaron los fagos eluidos, y aislados individuales de cada librería (86 por condición de elución) se seleccionaron al azar y se ensayaron por técnicas ELISA estándar en cuanto a unión al factor VIII diana. Los fagos unidos fueron detectados con anticuerpo policlonal anti-M13 conjugado con HRP (Pharmacia). Se usó un sustrato de peroxidasa TMB para HRP en el mecanismo de detección ELISA. El sustrato TMB produce un color azul después de la digestión con peroxidasa. El color es cuantificado por absorbancia a OD₆₃₀. Los aislados de fagos que proporcionaron una señal significativa (OD₆₃₀ > 0,25) por encima del fondo fueron considerados clones positivos. Se realizó una secuenciación de ADN de estos aislados para identificar el péptido presentado.

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos presentados fueron deducidas a partir de las secuencias de ADN obtenidas. Los datos de secuencias de los aislados de fagos fueron agrupados por librería y clasificados según el grado de similitud. La frecuencia a la que se obtuvo cualquier secuencia dada fue apuntada, dado que esta indica una selección por un ligante específico. Se encontró que los aislados de fagos que tenían el mismo péptido presentado estaban presentes en las poblaciones de fagos obtenidas por ambos de los dos métodos de elución.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión a diana de la librería TN7				
TN7 aislado	secuencia	frecuencia (elución)	señal de ELISA	SEQ ID NO:
A06	His-Ser-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Phe-Ala	7/96 (EG)	0,5	4
A08	Phe-Gly-Cys-Ser-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Pro-Phe	2/96 (EG)	0,4	5
D03	Pro-His-Cys-Asn-Trp-Leu-Phe-Pro-Cys-Ser-Leu	7/192 (EG/pH2)	0,2	6
D04	Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Ile-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala	6/192 (EG/pH2)	0,3	7
A09	Phe-His-Cys-Ile-Gly-Val-Trp-Phe-Cys-Leu-His	2/192 (EG/pH2)	0,1	8
C5/G10	Arg-Leu-Cys-Ser-Trp-Val-Ser-Pro-Cys-Ser-Ala	1/96 (EG)	0,5	9

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión a diana de la librería TN8				
TN8 aislado	secuencia	frecuencia (elución)	señal de ELISA	SEQ 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-Cys-Gly-Ser-Trp-Phe-Arg-Pro-Cys-His-Ala	3/192	0,4	15

E02	His-Leu-Cys-Gly-Ala-Trp-Phe-Arg-Pro-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/G10	His-Arg-Cys-Gly-Ser-Trp-Leu-His-Pro-Cys-Leu-Ala	1/96 (EG)	0,3	21

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión a diana de la librería TN9				
TN9 aislado	secuencia	frecuencia (elución)	señal de ELISA	SEQ ID NO:
B04	Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His	6/192 (EG/pH2)	0,8	22
G02	Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala-His-Cys-Leu	2/96 (EG)	0,2	23
B01	Phe-Cys-His-Val-Phe-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 diana

- 5 En base a los datos presentados anteriormente, se seleccionaron y sintetizaron nueve péptidos para 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 fagos	Secuencia (bucle de disulfuro subrayado)	Densidad de ligando, mg/ml ($\mu\text{mol/ml}$)
CS-453	C10-TN8	AEGTGDHPC <u>GSWL</u> RPCLHDPGPEG ^{GGGS} -NHNH ₂	2,64 (0,98)
CS-454	E02-TN8	AEGTGDHLC <u>GAWFR</u> PCDADPGPEG ^{GGGS} -NHNH ₂	1,79 (0,67)
CS-455	A09-TN7	AEGTGDFHC <u>IGVWF</u> CLHDPGEG ^{GGGS} -NHNH ₂	2,21 (0,83)
CS-456	A08-TN7	AEGTGDFGCS <u>WL</u> FPCFPDPGPEG ^{GGGS} -NHNH ₂	3,69 (1,43)
CS-458	B04-TN9	AEGTGDFC <u>WVFA</u> FDHCHDPGPEG ^{GGGS} -NHNH ₂	3,15 (1,17)
CS-459	E09-TN9	AEGTGDFC <u>WVFP</u> FQHCADPGPEG ^{GGGS} -NHNH ₂	2,72 (1,02)
CS-460	D06-TN9	AEGTGDFC <u>WVFP</u> FHHCDFDPGPEG ^{GGGS} -NHNH ₂	4,24 (1,54)
GI-1	C05-/G10-TN7	Acetil-AEGTGDRLC ^{SW} SPCSADPEG ^{GGSK}	0,83 (0,32)
GI-2	A11/G10-TN8	Acetil-AEGTGDHRC ^{GSWL} HPCLADPEG ^{GGSK}	0,43 (0,16)

Los péptidos de afinidad de la Tabla 4 se identifican, en el orden anterior, con las SEQ ID NOs: 36-44.

- 5 Los nueve péptidos de afinidad anteriores se produjeron por métodos de síntesis en fase sólida clásicos descritos anteriormente. Para facilitar la inmovilización en un soporte sólido, se incorporó una región enlazadora corta hidrazida-funcional de siete aminoácidos (-PGPEG^{GGGS}-NHNH₂; SEQ ID NO: 45) en el término carboxi 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, -PEG^{GGSK}; (SEQ ID NO: 46), que exhibe una lisina C-terminal para inmovilización y un amino-término acetilado.

10 Los ligandos candidatos se inmovilizaron sobre una resina cromatográfica de metacrilato de etilenglicol sustituido con formilo (Toyopearl Formyl 650-M, tamaño de poro de ~ 1000 Å; TosoHaas, Montgomeryville, PA). Los péptidos que contienen hidrazida fueron inmovilizados facilitando la formación del enlace hidrazona, los péptidos GI-1 y GI-2 fueron inmovilizados por medio de aminación reductiva usando NaCNBH₃. La cantidad de polipéptido inmovilizado en el soporte sólido se determinó cuantificando la cantidad de polipéptido libre que quedaba en solución. La cantidad de ligando inmovilizado por ml de resina estuvo en el intervalo de 0,7-1,5 μmol para los péptidos inmovilizados por hidrazina.

15 Los nueve péptidos fueron evaluados por cromatografía de afinidad en cuanto a su capacidad de capturar el REFACTO® descrito en el Ejemplo I, bajo condiciones de unión y liberación específicas. Los tampones usados en estas evaluaciones se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5

Condiciones de unión y elución empleadas

Tampón de unión	NH ₄ OAc 100mM, pH 6,3, NaCl 0,8M, Sorbitol 1M, Tween 80 al 0,02%, EDTA 3mM, CaCl ₂ 5mM
Tampón de elución A	Etilenglicol al 50%, His 20mM, NaCl 0,25M, CaCl ₂ 20mM, Tween 80 al 0,01%, pH 7
Tampón de elución B	CaCl ₂ 0,35M, His 20mM, NaCl 0,3M, Tween 80 al 0,01%, pH 7
limpieza a pH 2	Gly 100mM, NaCl 1M, pH 2

25 El polipéptido similar al factor VIII (REFACTO®) se diluyó en tampón SP hasta una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$. Cada una de las resinas de afinidad (~ 350 μl) se introdujeron en columnas de vidrio, y se aplicaron aproximadamente 150 μg del factor VIII diana a las columnas de afinidad preparadas a un caudal de 200 $\mu\text{l/minuto}$ (velocidad lineal de 170 cm/hora). El material unido se eluyó secuencialmente con los tampones mostrados en la Tabla 5, y la elución de las proteínas fue seguida por absorbancia UV a 280 nm. Se recogieron las fracciones y la

masa y actividad del polipéptido similar al factor VIII recuperado se determinó por HPLC de fase inversa y por ensayo enzimático.

Para la determinación de la masa, se generó una curva patrón con REFACTO® (0-200 µg) y la cantidad presente en cada fracción se calculó según técnicas bien conocidas en la técnica. Se usó HPLC de fase inversa en presencia de EDTA 20 mM para romper la molécula de REFACTO® en sus subunidades componentes, que fueron eluidas con un gradiente de acetonitrilo/TFA al 0,01%. El ensayo de actividad fue un ensayo basado en los factores IX, X. Los resultados para cada resina de afinidad se exponen a continuación (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 no tratada	RP-HPLC	64,4	2,8	0	0	67,2
	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	2,5	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 del factor VIII diana recuperado después de cromatografía sobre los nueve ligandos estuvo en el intervalo de 40-67%. Los ligandos polipeptídicos CS-453, CS-454, CS-456 y CS-459 capturaron virtualmente todo el factor VIII diana aplicado, siendo el material unido eluido en presencia de etilenglicol. No se encontró actividad en el eluante de pH 2, por lo tanto se supuso que nada de la diana quedó unida al ligando. La incapacidad de las resinas CS-455 y GI-1 de capturar la diana puede ser debida a degradación o inestabilidad del péptido, o a baja densidad de ligando en el soporte.

Ejemplo III: Unión comparativa de nhfVIII y REFACTO®

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

Para estos experimentos, se obtuvo nhfVIII de American Diagnostica, Inc. (Greenwich, CT; producto #408 nat) en la forma de un polvo liofilizado que contenía agentes estabilizantes. El nhfVIII se reconstituyó según las instrucciones del fabricante en un tampón de reconstitución (NH_4OAc 72mM, pH 6,3, NaCl 360mM, Tween 80 0,04%) (Tampón 1).

Se usó un kit de ELISA comercial (IMUBIND fVIII ELISA kit, Producto #884, American Diagnostica, Inc., Greenwich, CT), desarrollado para detectar el factor VIII, según las instrucciones del fabricante a fin de detectar tanto las dianas REFACTO® como nhfVIII. El kit emplea un ensayo ELISA sandwich en el que la diana es capturada por un anticuerpo monoclonal inmovilizado, y la diana capturada es detectada con un segundo conjugado anticuerpo monoclonal-peroxidasa de rábano picante (HRP). La adición del sustrato de peroxidasa y su posterior reacción con la HRP produce un color azul (detectado a 630 nm) que cambia a amarillo (detectado a 450 nm) tras la adición de la disolución de detención de ácido sulfúrico 0,5 N. La respuesta de color es calibrada con patrones de factor VIII proporcionados por el fabricante.

La unión a REFACTO® se ensayó en el Tampón 1. La unión tanto de REFACTO® como de nhfVIII se ensayó 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 Formyl 650-M. La densidad de ligando para cada polipéptido fue 1,79 mg/ml (0,67 $\mu\text{mol/ml}$), 3,69 mg/ml (1,43 $\mu\text{mol/ml}$) y 3,15 mg/ml (1,17 $\mu\text{mol/ml}$) respectivamente.

Para cada uno de los tres péptidos inmovilizados ensayados, perlas de péptido de 200 μl de una suspensión de polipéptido acoplado a Toyopearl se centrifugaron brevemente (30 segundos a 2000 x g a temperatura ambiente), el fluido sobrenadante se retiró, 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 hasta una concentración final de 200 U/ml en Tampón 1, y 250 μl de la solución diluida (~ 50 U total) se añadieron a un sedimento lavado de cada una de las perlas de péptido. La suspensión se incubó en una mezcladora de tambor vertical a temperatura ambiente durante una hora, periodo de unión después del cual las perlas fueron convertidas en un sedimento por centrifugación (30 segundos, 2000 x g) y las soluciones sobrenadantes, que representaban la fracción no unida ("No unido" en la Tabla 7, a continuación), se retiraron y conservaron para el ensayo de la actividad del factor VIII no unido.

Las perlas convertidas en sedimento se lavaron una vez añadiendo 250 μl de Tampón 1, se mezclaron brevemente y la suspensión se centrifugó como antes. Las soluciones sobrenadantes ("Lavado" en la Tabla 7), se retiraron y conservaron para el ensayo de la actividad del factor VIII.

Los sedimentos lavados se resuspendieron en 250 μl de Tampón A (L-histidina-HCl 20mM, NaCl 250mM, CaCl_2 20mM, Tween 80 al 0,01%, etilenglicol al 50%, pH 6,3) y se incubaron en una mezcladora de tambor vertical durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al final del periodo de elución, se centrifugaron las suspensiones como anteriormente. Las soluciones sobrenadantes ("Eluato" en la Tabla 7), se retiraron y conservaron para el ensayo de la actividad del factor VIII eluido.

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

Tabla 7

Unión y elución discontinua de REFACTO® con ligandos polipeptídicos inmovilizados

Ligando peptídico inmovilizado	% de entrada recuperada 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 ensayado, casi todo del REFACTO® (> 75%) añadido a la reacción de unión fue recuperado en las fracciones No unido, Lavado y Eluato. Una pequeña cantidad de material (10%-25%) puede haber sido retenido en las perlas después de la elución.

Después, las perlas de afinidad fueron regeneradas mediante un lavado en etilenglicol al 50%, His 20mM, NaCl 0,25M, CaCl_2 20mM, Tween 80 al 0,01%, pH 7, y dos lavados con 250 μl de H_3PO_4 30mM, NaCl 1M, pH 2 (15 minutos para cada lavado). Después de los lavados a pH 2, las perlas se lavaron una vez en PBS que contenía azida al 0,05% y se almacenaron a 4°C.

Una muestra de nhfVIII se diluyó hasta una concentración final de 100 U/ml por adición de 2,32 ml de H₂O, 180 µl de NH₄OAc 1M, pH 6,3 (hasta 72 mM), y 1 µl de Tween 80 (hasta 0,04%). La solución madre de REFACTO® se diluyó hasta 100 U/ml en un Tampón 1 modificado, en el que la concentración de NaCl se redujo de 660mM a 330mM.

Los péptidos inmovilizados se ensayaron en cuanto a la unión a nhfVIII en comparación con REFACTO®. Como control de no unión, un polipéptido de la librería TN9 (B10), que se une a una diana no relacionada y no se une a un factor VIII diana, se inmovilizó en las mismas perlas de metacrilato, como se describe anteriormente. Después, las soluciones de nhfVIII y REFACTO® se mezclaron con perlas de afinidad regeneradas que portaban los ligandos CS-454, CS-456 y CS-458 en un procedimiento de purificación discontinuo comparativo. Las condiciones de reacción se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8

Condiciones de reacción para el ensayo de unión a nhfVIII

Ligando peptídico inmovilizado	Volumen de la suspensión de perlas (µl)	Diana (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 estas pruebas se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9

Unión y elución discontinua de nhfVIII y REFACTO® con ligandos polipeptídicos inmovilizados

Ligando peptídico inmovilizado	Diana	% de total recuperado en:		
		No unido	Lavado	Eluato
CS-454	hfvIII	67	12	21
CS-456	hfvIII	70	14	16
CS-458	hfvIII	48	13	39
TN9-B10	hfvIII	86	14	0
CS-458	REFACTO®	59	14	27
TN9-B10	REFACTO®	90	10	0

En conclusión, los ligandos polipeptídicos inmovilizados, CS-458, CS-454 y CS-456 se unen a y liberan nhfVIII bajo condiciones similares y con rendimientos similares a los observados previamente con un polipéptido similar al factor VIII.

Siguiendo la descripción precedente, se pueden apreciar las importantes características para moléculas de unión por afinidad que permiten la detección o separación de factor VIII o polipéptidos similares al factor VIII en o de cualquier solución. Realizaciones adicionales de moléculas de unión de la invención y métodos alternativos adaptados a una solución o corriente de alimentación particular serán evidentes a partir del estudio de la descripción precedente. Todas las tales realizaciones y alternativas obvias pretenden estar dentro del alcance de esta invención, definida por las reivindicaciones que siguen.

7293(2) Listado de secuencias - 11.03.09

LISTADO 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 similares al Factor VIII humano

<130> DYX-008.0 PCT

10 <140> PCT/US00/00043
<141> 2000-01-03
<150> 09/224.785
<151> 1999-01-04
<160> 46

15 <170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(2)

25 <223> Xaa1 es Arg, Phe, His o Pro; Xaa2 es Ser, Gly, Leu o His
<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(8)

30 <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
<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(11)
<223> Xaa8 es Ser, Leu, Pro o Phe; Xaa9 es Ala, Phe, Leu o His

35 <400> 1
Xaa Xaa Xys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(2)
 10 <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
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa7 es Leu o Phe; Xaa8 es Arg, Asn o His
 <220>
 20 <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
 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Pro Cys Xaa Xaa
 25 1 5 10
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> 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>

5 <221> VARIANTE
 <222> (8)
 <223> Xaa8 es Ala, Asn, Asp, Gln, His, Leu, Ser o Val
 <220>
 <221> VARIANTE

10 <222> (11)
 <223> Xaa11 es Ala, Asp, His, Leu, Phe o Ser
 <400> 3
 Phe Cys Xaa Val Xaa Xaa Phe Xaa His Cys Xaa
 1 5 10

15 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <400> 4
 His Ser Cys Gly Ser Trp Leu Phe Pro Cys Phe Ala
 1 5 10

25 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <400> 5
 Phe Gly Cys Ser Trp Leu Phe Pro Cys Pro Phe
 1 5 10

35 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 6

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

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 7

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

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 8

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

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 9

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

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 10

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

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 11

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

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 12

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

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 13

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

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 14

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

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 15

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

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 16

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

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 17

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

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 18

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

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 19

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

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 20

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

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 21

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

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 22

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

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 23

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

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 24

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

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 25

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

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 26

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

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 27

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

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 28

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

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión

<400> 29

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

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <400> 30
 Phe Cys Trp Val Phe Pro Phe His His Cys Phe
 5 1 5 10

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <400> 31
 Phe Cys His Val Phe Asn Phe Val His Cys Ser
 15 1 5 10

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido en bucle sintético de unión
 <400> 32
 Phe Cys His Val Phe Pro Phe Leu His Cys Asp
 25 1 5 10

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: plantilla para péptido en bucle sintético de unión
 <220>
 <211> VARIANTE
 35 <222> (1)..(11)
 <223> las posiciones de aminoácido 3 y 9 son cys invariante; todas las demás posiciones Xaa son variadas pero no Cys, para proporcionar una librería de 5x10(9) péptidos diferentes basados en la secuencia plantilla
 <400> 33
 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 40 1 5 10

- <210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: plantilla para péptido en bucle sintético de unión
<220>
<211> VARIANTE
<222> (1)..(12)
- 10 <223> las posiciones de aminoácido 3 y 10 son cys invariante; todas las demás posiciones Xaa son variadas pero no Cys, para proporcionar una librería de 6x10(9) péptidos diferentes basados en la secuencia plantilla
<400> 34
Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10
- 15 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: plantilla para péptido en bucle sintético de unión
<220>
<211> VARIANTE
<222> (1)..(11)
- 25 <223> las posiciones de aminoácido 2 y 10 son cys invariante; todas las demás posiciones Xaa son variadas pero no Cys, para proporcionar una librería de 5x10(9) péptidos diferentes basados en la secuencia plantilla
<400> 35
Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10
- 30 <210> 36
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 35 <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 Leu His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15 20 25
- 40

<210> 37

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

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

<400> 37

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

10

<210> 38

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <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 His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15 20 25

20

<210> 39

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <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 Phe Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15 20 25

30

<210> 40

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <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 His Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15 20 25

40

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

5 <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 Ala Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15 20 25

10 <210> 42
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <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 Phe Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15 20 25

20 <210> 43
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <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 Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
 1 5 10 15 20 25

30 <210> 44
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <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 Leu Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
 1 5 10 15 20 25

40

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: enlazador de inmovilización sintético para péptido C-terminal

<400> 45

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: enlazador de inmovilización sintético para péptido C-terminal

<400> 46

Pro Glu Gly Gly Gly Ser Lys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que se une al factor VIII y/o a un polipéptido similar al factor VIII, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos:

5 Phe-Cys- X_{18} -Val- X_{19} - X_{20} -Phe- X_{21} -His-Cys- X_{22} (SEQ ID NO: 3), en donde X_{18} es His o Trp; X_{19} es His o Phe; X_{20} es Ala, Asn, His o Pro; X_{21} es Ala, Asn, Asp, Gln, His, Leu, Ser, o Val; X_{22} es Ala, Asp, His, Leu, Phe o Ser.

2. Un polipéptido que se une al factor VIII y/o a un polipéptido similar al factor VIII, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His;

10 Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala-His-Cys-Leu;

Phe-Cys-His-Val-Phe-His-Phe-Ser-His-Cys-Asp;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Asn-Phe-Ser-His-Cys-Ser;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Asp;

15 Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Ser;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Gln-His-Cys-Ala;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-His-His-Cys-Phe;

Phe-Cys-His-Val-Phe-Asn-Phe-Val-His-Cys-Ser; y

Phe-Cys-His-Val-Phe-Pro-Phe-Leu-His-Cys-Asp;

20 o un polipéptido que se une al factor VIII y/o a un polipéptido similar al factor VIII, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

AEGTGDFCWVFAFDHCHDPGPEGGS-NH₂;

AEGTGDFCWVFPFQHCADPGPEGGS-NH₂; y

25 AEGTGDFCWVFPFHCFDPGPEGGS-NH₂.

3. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde el polipéptido es capaz de unirse al factor VIII humano y/o a un polipéptido similar al factor VIII en una solución que comprende: NH₄OAc 100mM, NaCl 0,8M, Sorbitol 1M, Tween 80 al 0,02%, EDTA 3mM, CaCl₂ 5mM, pH 6,3, y disociarse de dicho factor VIII humano y/o polipéptido similar al factor VIII en una solución que contiene etilenglicol al 50%.

30 4. El polipéptido según la reivindicación 3, que se disocia de dicho factor VIII humano y/o polipéptido similar al factor VIII cuando se pone en contacto con una solución que comprende etilenglicol al 50%, His 20mM, NaCl 0,25mM, CaCl₂ 20mM, Tween 80 al 0,01%, pH 7.

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

35 Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His;

Phe-Cys-Trp-Val-His-Pro-Phe-Ala-His-Cys-Leu;

Phe-Cys-His-Val-Phe-His-Phe-Ser-His-Cys-Asp;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Ala-Phe-Asp-His-Cys-His;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Asn-Phe-Ser-His-Cys-Ser;

40 Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Asp;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Asn-His-Cys-Ser;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-Gln-His-Cys-Ala;

Phe-Cys-Trp-Val-Phe-Pro-Phe-His-His-Cys-Phe;

Phe-Cys-His-Val-Phe-Asn-Phe-Val-His-Cys-Ser; y

Phe-Cys-His-Val-Phe-Pro-Phe-Leu-His-Cys-Asp;

- 5 o el polipéptido según la reivindicación 3, en donde la molécula de unión es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

AEGTGDFCWVFAFDHCHDPGPEGGS-NH₂;

AEGTGDFCWVFPFQHCADPGPEGGS-NH₂; y

AEGTGDFCWVFPFHCFDPGPEGGS-NH₂.

- 10 6. Un método para detectar factor VIII humano y/o un polipéptido similar al factor VIII en una solución sospechosa de contenerlo, que comprende:

- (a) poner en contacto tal solución con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5; y
- (b) determinar si se ha producido unión entre dicho polipéptido y dicho factor VIII humano y/o polipéptido similar al factor VIII.

7. Un método para purificar factor VIII humano y/o polipéptido similar al factor VIII, que comprende:

- 15 (a) inmovilizar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en un soporte sólido;
- (b) poner en contacto una solución que contiene factor VIII humano y/o un polipéptido similar al factor VIII con dicho soporte;
- (c) separar la solución de dicho soporte; y
- (d) obtener el factor VIII humano y/o polipéptido similar al factor VIII del soporte.

- 20 8. Medios de separación, que comprenden:

- (a) un material matricial cromatográfico, y, inmovilizado en el mismo,
- (b) un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

9. Medios de separación, que comprenden el producto de reacción de:

- 25 (a) un material matricial cromatográfico reactivo con aminas, y
- (b) un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

10. Los medios de separación de la reivindicación 9, en donde dicho material matricial es una resina cromatográfica de metacrilato aldehído-funcional.

11. Los medios de separación de la reivindicación 10, en donde dicha resina es un soporte copolimérico de etilenglicol-metacrilato sustituido con formilo.

- 30 12. Un método para separar factor VIII o un polipéptido similar al factor VIII de una solución que lo contiene, que comprende:

- (a) poner en contacto dicha solución con los medios de separación según cualquiera de las reivindicaciones 8-11 bajo condiciones de unión,
- (b) retirar el material no unido, y

- 35 (c) eluir el factor VIII o polipéptido similar al factor VIII unido de dichos medios de separación.