

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 690**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009 E 09714286 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2257311**

54 Título: **Moléculas conjugadas del Factor VIII**

30 Prioridad:

27.02.2008 US 32006

08.04.2008 US 43354

04.06.2008 US 58869

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

15.07.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN;

VANDAHL, BRIAN BERG STIDSEN;

BOLT, GERT;

STENNICKE, HENNING RALF;

THIM, LARS y

STEENSTRUP, THOMAS DOCK

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 476 690 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 conjugadas del Factor VIII.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a moléculas conjugadas de coagulación del Factor VIII. En particular, la presente invención se refiere a moléculas conjugadas del Factor VIII que tienen una vida media circulatoria modificada.

10 Antecedentes de la invención

[0002] La hemofilia A es un trastorno de sangrado hereditario causado por deficiencia o disfunción de la actividad del Factor VIII de coagulación (FVIII). La manifestación clínica no está en la hemostasis primaria - normalmente tiene lugar la formación de coágulos de sangre - pero el coágulo es inestable debido a una carencia de formación de trombina secundaria. La enfermedad es tratada por inyección intravenosa del Factor de coagulación FVIII, el cual se aísla de la sangre o se produce de manera recombinante.

[0003] Las recomendaciones de tratamiento actual son cambiar el tratamiento de demanda tradicional por la profilaxis. La vida media circulatoria del FVIII endógeno es de 12-14 horas y el tratamiento profiláctico tiene que ser realizado de este modo varias veces por semana para obtener virtualmente una vida sin síntomas para los pacientes. La administración IV para muchos, especialmente para niños y personas jóvenes, está asociada con inconveniencia y/o dolor significativo. Existe de este modo una necesidad en la técnica de nuevos productos del Factor VIII con la actividad del Factor VIII, que sean preferiblemente homogéneos en estructura, preferiblemente seguros y que tengan preferiblemente una vida media circulatoria significativamente prolongada, para reducir el número de administración del Factor VIII por semana. Existe además una necesidad en la técnica de métodos simplemente relativos para obtener y producir tales moléculas.

[0004] La PEGilación del Factor VIII para prolongar la vida media circulatoria se conoce en la técnica. Sin embargo, ha sido un obstáculo para obtener productos seguros que tengan una estructura homogénea, así como también una vida media circulatoria significativamente mejorada. Los métodos disponibles para producir moléculas conjugadas del Factor VIII son a menudo laboriosos y/o tienden a conllevar bajos rendimientos y/o productos que no son homogéneos en estructura. El uso de sitios de glicosilación O-ligados diseñados artificialmente para obtener proteínas terapéuticas que tengan una vida media circulatoria prolongada de proteínas terapéuticas ha sido sugerido en el documento WO2008011633, sin embargo, ahí se describen moléculas no conjugadas del Factor VIII.

35 Resumen de la invención

[0005] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula del Factor VIII truncada del dominio B con una vida media circulatoria modificada, dicha molécula es conjugada de forma covalente con un polímero hidrofílico por medio de un oligosacárido O-ligado en el dominio truncado B, donde la activación del Factor VIII conlleva eliminar el grupo lateral conjugado de forma covalente, donde las porciones de la cadena pesada y ligera del polipéptido precursor de FVIII son separadas por un enlace, donde la secuencia del enlace deriva del dominio B de FVIII y donde el enlace contiene una secuencia de reconocimiento para la proteasa que separa el polipéptido precursor de FVIII truncado del dominio B en la cadena pesada y ligera.

[0006] En otros aspectos, la presente invención además se refiere a métodos para obtener tales moléculas, el uso de tales moléculas en terapias y composiciones farmacéuticas que comprendan tales moléculas.

[0007] Lo que de este modo se proporciona es una molécula conjugada del Factor VIII con vida media circulatoria modificada, donde el grupo lateral conjugado (por ejemplo, polímero hidrofílico) se elimina después de la activación. Las moléculas de acuerdo con la invención, son preferiblemente homogéneas en estructura - al menos con respecto a la posición del polímero hidrofílico en el dominio B truncado - y preferiblemente tienen un perfil de seguridad ventajoso. Del mismo modo, en la presente son proporcionados además métodos relativamente simples para obtener tales moléculas. Preferiblemente, las moléculas activadas del Factor VIII de acuerdo con la invención, son similares al Factor VIII activado endógeno.

Descripción detallada de la invención*Definiciones:*

[0008] Moléculas del Factor VIII: El Factor FVIII/FVIII es una glicoproteína compleja y grande que principalmente se produce por hepatocitos. El FVIII contiene 2351 aminoácidos, incluido el péptido de señalización, y contiene varios dominios distintos como se define por homología. Existen tres dominios A, un dominio único B y dos dominios C. El orden de los dominios puede ser enumerado como NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. El FVIII circula en el plasma como dos cadenas, separado en el borde B-A3. Las cadenas están conectadas por enlaces iónicos de metal bivalente. La cadena A1-A2-B es llamada la cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés), mientras que la A3-C1-C2 es llamada la

cadena ligera (LC, por sus siglas en inglés).

5 [0009] Las moléculas endógenas del Factor VIII circulan *in vivo* como una combinación de moléculas con dominios B de varios tamaños. Lo que probablemente tiene lugar *in vivo* es una eliminación enzimática gradual del dominio B que conlleva una combinación de moléculas con dominios B de varios tamaños. En general, se cree que el desdoblamiento en la posición 740, por el cual la última parte del dominio B se elimina, ocurre en conjunto con la activación de trombina. Sin embargo, no puede ser una regla que una variante del Factor VIII en la cual por ejemplo, el sitio de desdoblamiento en la posición 740 ha sido deteriorado, pueda ser activo.

10 [0010] El "Factor VIII" o "FVIII" como se usa en la presente, se refiere a una glicoproteína de plasma humana que es un miembro de la trayectoria de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación sanguínea. El "FVIII Nativo" es la molécula humana FVIII de longitud completa como se muestra en la SEC ID NO. 1 (aminoácido 1-2332). El dominio B recorre los aminoácidos 741-1648 en la SEC ID NO 1.

15 SEC ID NO 1:

ATTRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIA
 KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK
 EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG
 LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFI
 QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFM
 AYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFNMERDLASGLIGPLLYCYKES
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYV
 FDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLPFSGETVFM SMEN
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDY YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSR
 HPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEA
 KYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKL
 DFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTLFGKKSSPLTESGGPLSLS
 EENNSDKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTN
 KTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNH
 MSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDM SFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGP
 SPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTLNLDNLHENN
 THNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTG TKNFMKNLFLSTRQNVESYD GAYAPVLQ
 DFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSK
 RALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSP LSDLCTR
 SHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGA KKN
 NLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHIYQK
 DLFP TETSNGSPGHLDLVEGSL LGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLA
 WDNHYGTQIPKEEWKSQEK SPEKTAFFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAK
 QGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ
 KKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNE
 HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEP RKNFVKPNETKTYFW
 KVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFA
 LFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRI
 RWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLI
 GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWS
 TKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFF
 GNVDSSGIKHNI FNPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITA
 SSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT TQGVKSL
 TSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDP LLLTRYLRIHPQSWV
 HQIALRMEVLGCEAQDLY

0011] Las moléculas del Factor VIII de acuerdo con la presente invención son moléculas del Factor VIII truncadas del dominio B donde los dominios restantes corresponden a la secuencia como se expone en el aminoácido no. 1-740 y 1649-2332 en la SEC ID NO. 1. Resulta que las moléculas de acuerdo con la invención son moléculas recombinantes producidas en células hospederas transformadas, preferiblemente de origen mamífero. Sin embargo, los dominios restantes (es decir, los tres dominios A y los dos dominios C) pueden diferir ligeramente, por ejemplo, aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % de la secuencia de aminoácido como se expone en la SEC ID NO 1 (aminoácidos 1-740 y 1649-2332). En particular, es posible que se introduzcan modificaciones de aminoácidos (sustituciones, supresiones, etc.), en los dominios restantes, por ejemplo, para modificar la capacidad de enlace del Factor VIII con varios otros componentes tales como, por ejemplo, el factor vW, LPR, varios receptores, otros factores de coagulación, superficies celulares, etc. Además, es plausible que las moléculas del Factor VIII de acuerdo con la invención comprendan otras modificaciones postraduccionales en, por ejemplo, el dominio B truncado y/o en uno o más de los otros dominios de las moléculas. Estas otras modificaciones postraduccionales pueden ser en forma de varias moléculas conjugadas con la molécula del Factor VIII de acuerdo con la invención tal como por ejemplo, compuestos poliméricos, compuestos peptídicos, compuestos derivados de ácidos grasos, etc.

[0012] Las moléculas del Factor VIII de acuerdo con la presente invención, a pesar de que sean modificadas fuera del dominio B o no, tengan otras modificaciones postraduccionales o no, todas tienen actividad del Factor VIII, que es la capacidad para funcionar en la cascada de coagulación en una manera funcionalmente similar o equivalente a FVIII, inducen la formación de FXa por medio de interacción con FIXa en una plaqueta activada y soportan la formación de un coágulo de sangre. La actividad puede ser valorada *in vitro* por técnicas bien conocidas en el arte, tales como por ejemplo, análisis de coágulo, análisis potencial de trombina endógena, etc. Las moléculas del Factor VIII de acuerdo con la presente invención tienen actividad de FVIII de al menos aproximadamente 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % y 100 % o aún más del 100 % de aquella del FVIII humano nativo.

[0013] Dominio B: El dominio B en el Factor VIII recorre los aminoácidos 741 - 1648 en la SEC ID NO 1. El dominio B es desdoblado en varios sitios diferentes, generando gran heterogeneidad en las moléculas FVIII del plasma de circulación. Se desconoce la función exacta del dominio B fuertemente glicosilado. Lo que se sabe es que el dominio es indispensable para la actividad FVIII en la cascada de coagulación. Esta aparente carencia de función es soportada por el hecho de que el FVIII suprimido/truncado de dominio B parece tener propiedades *in vivo* idénticas a aquellas observadas en el FVIII nativo de longitud completa. Lo que se dice es que existen indicaciones de que el dominio B puede reducir la asociación en la membrana celular, al menos bajo condiciones libres de suero.

[0014] Molécula del Factor VIII truncado/suprimido de dominio B: El FVIII endógeno de longitud completa es sintetizado como una molécula precursora de cadena única. Previamente a la secreción, el precursor es desdoblado en la cadena pesada y en la cadena ligera. El FVIII recombinante de dominio B suprimido puede ser producido a partir de dos estrategias diferentes. O bien la cadena pesada sin el dominio B y la cadena ligera son sintetizadas individualmente como dos cadenas de polipéptidos diferentes (estrategia de dos cadenas) o bien el FVIII de dominio B suprimido es sintetizado como una cadena de polipéptido precursor único (estrategia de cadena única) que es desdoblada en las cadenas pesada y ligera en la misma forma que el precursor FVIII de longitud completa.

[0015] En un polipéptido precursor FVIII de dominio B suprimido, las porciones de cadena pesada y ligera son separadas normalmente por un enlace. Para minimizar el riesgo de introducir epítopes inmunogénicos en el FVIII suprimido de dominio B, la secuencia del enlace preferiblemente deriva del dominio B de FVIII. El enlace debe comprender un sitio de reconocimiento para la proteasa que separe el polipéptido precursor FVIII de dominio B suprimido en la cadena pesada y ligera. En el dominio B de FVIII de longitud completa, el aminoácido 1644-1648 constituye el sitio de reconocimiento. El sitio de trombina que conduce a la eliminación del enlazador en la activación del FVIII de dominio B suprimido se localiza en la cadena pesada. De este modo, el tamaño y secuencia de aminoácido del enlace no es probable que tenga influencia en su eliminación a partir de la molécula FVIII restante por activación de trombina. La supresión del dominio B es una ventaja para la producción de FVIII. Sin embargo, partes del dominio B pueden ser incluidas en el enlace sin reducir la productividad. El efecto negativo del dominio B en la productividad no ha sido atribuido a ningún tamaño o secuencia específicos del dominio B.

[0016] El dominio B truncado puede contener varios sitios de O-glicosilación. Preferentemente, la molécula comprende solamente uno, alternativamente dos, tres o cuatro oligosacáridos O-ligados en el dominio B truncado.

[0017] Preferentemente, el dominio B truncado comprende solamente un sitio de O-glicosilación potencial y el polímero hidrofílico es conjugado de forma covalente a este sitio de O-glicosilación.

[0018] Los oligosacáridos O-ligados en las moléculas truncadas de dominio B, de acuerdo con la invención, pueden estar unidos a sitios de O-glicosilación que fueron creados artificialmente por medios recombinantes y/o por exposición de sitios de O-glicosilación "escondidos" por truncación del dominio B. En ambos casos, tales moléculas pueden hacerse diseñando una secuencia de aminoácido de Factor VIII truncado de dominio B y sometiendo subsecuentemente la secuencia de aminoácido a un análisis *in silico* que prediga la probabilidad de sitios de O-glicosilación en el dominio B truncado. Las moléculas con una probabilidad relativamente alta de tener tales sitios de glicosilación pueden ser sintetizadas en una célula hospedera adecuada seguida por análisis del patrón de glicosilación y subsecuente selección

de moléculas que tienen glicosilación O-ligada en el dominio B truncado. Las células hospederas adecuadas para producir proteínas recombinantes del Factor VIII son preferiblemente de origen mamífero para asegurar que la molécula sea glicosilada. En la práctica de la presente invención, las células son células de mamífero, más preferiblemente, una línea establecida de células de mamífero que incluya, sin limitación, líneas de células CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), riñón de hámster bebé (BHK) y HEK293 (por ejemplo, ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea de células BHK preferida es la línea de células BHK tk-ts13 BHK (Waechter and Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 1106-1110, 1982), posteriormente denominadas células BHK 570. La línea de células BHK 570 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo el número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea de células BHK tk- ts13 también está disponible en la ATCC bajo el número de acceso CRL 1632. Una línea de células CHO preferidas es la línea CHO K1 disponible en ATCC bajo el número de acceso CC161, así como también líneas de células CHO-DXB11 y CHO-DG44.

[0019] Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1); células DUKX (línea de células CHO) (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980) (las células DUK.X también son referidas como células DXB11) y DG44 (línea de células CHO) (Cell, 33: 405, 1983, and Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986). También son útiles las células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mieloma con otras células. En algunas modalidades, las células pueden ser células mutantes o recombinantes, tales como, por ejemplo, células que expresan un espectro cuantitativamente o cualitativamente de enzimas que catalizan la modificación postraduccional de proteínas (por ejemplo, enzimas de glicosilación tales como glicosil transferasas y/o glicosidasas, o enzimas de procesamiento tales como péptidos) diferente al del tipo de célula a partir del cual se derivan. Las células DUKX (línea de células CHO) son especialmente preferidas.

[0020] Las células actualmente preferidas son HEK293, COS, células de Ovario de Hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés), células de Riñón de Hámster Bebé (BHK, por sus siglas en inglés) y células de mieloma, en particular células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

[0021] La longitud del dominio B en la molécula FVIII tn es aproximadamente de 907 aminoácidos. La longitud del dominio B truncado en moléculas de acuerdo con la presente invención puede variar desde aproximadamente 10 aminoácidos hasta aproximadamente 700 aminoácidos, como por ejemplo, aproximadamente 12-500 aminoácidos, 12-400 aminoácidos, 12-300 aminoácidos, 12-200 aminoácidos, 15-100 aminoácidos, 15-75 aminoácidos, 15-50 aminoácidos, 15-45 aminoácidos, 20-45 aminoácidos, 20-40 aminoácidos o 20-30 aminoácidos. El dominio B truncado puede comprender fragmentos de la cadena pesada y/o la cadena ligera y/o una secuencia artificialmente introducida que no se encuentra en la molécula FVIII tn. Los términos "dominio B truncado" y "dominio B suprimido", pueden ser usados de manera intercambiable en la presente.

[0022] Vida media circulatoria modificada: Las moléculas de acuerdo con la presente invención tienen una vida media circulatoria modificada comparada con la molécula del Factor VIII de tipo nativo, preferiblemente una vida media circulatoria incrementada. La vida media circulatoria es preferiblemente incrementada al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 15 %, preferiblemente al menos un 20 %, preferiblemente al menos un 25 %, preferiblemente al menos un 30 %, preferiblemente al menos un 35 %, preferiblemente al menos un 40 %, preferiblemente al menos un 45 %, preferiblemente al menos un 50 %, preferiblemente al menos un 55 %, preferiblemente al menos un 60 %, preferiblemente al menos un 65 %, preferiblemente al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 75 %, preferiblemente al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 85 %, preferiblemente al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 100 %, más preferiblemente, al menos un 125 %, más preferiblemente, al menos un 150 %, más preferiblemente, al menos un 175 %, más preferiblemente, al menos un 200% y muy preferiblemente al menos un 250 % o 300 %. Aún más preferiblemente, tales moléculas tienen una vida media circulatoria que se incrementa al menos un 400 %, 500 %, 600 % o incluso un 700 % con relación a la vida media circulatoria del FVIII de tipo nativo.

[0023] Polímero hidrofílico: El polímero hidrofílico/grupo modificante de acuerdo con la presente invención, preferiblemente, no se origina naturalmente. En un ejemplo, el "grupo modificante que no se origina naturalmente" es un grupo modificante polimérico, en el cual al menos una porción polimérica no se origina naturalmente. En otro ejemplo, el grupo modificante que no se origina naturalmente es un carbohidrato modificado. El lugar de funcionalización con el grupo modificante se selecciona de manera que no previene al "azúcar modificado" de ser agregado enzimáticamente a un polipéptido. "Azúcar modificado" también se refiere a cualquier porción glicosilo mimética que es funcionalizada con un grupo modificante y la cual es un sustrato para una enzima modificada o natural, tal como una glicosiltransferasa.

[0024] El grupo modificante polimérico agregado a un polipéptido puede alterar una propiedad de tal polipéptido, por ejemplo, su biodisponibilidad, su actividad biológica o su vida media en el cuerpo. Polímeros ejemplares de acuerdo con la invención incluyen polímeros solubles en agua que pueden ser lineales o ramificados y pueden incluir uno o más porciones poliméricas seleccionadas independientemente, tales como poli(alquilenglicoles) y derivados de los mismos. El grupo modificante polimérico de acuerdo con la invención puede incluir un polímero soluble en agua, por ejemplo, poli(etilenglicol) y derivados de los mismos (PEG, m-PEG), poli(propilen glicol) y derivados de los mismos (PPG, m-PPG) y similares.

5 [0025] El término "soluble en agua" se refiere a porciones que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son bien conocidos en la técnica. Polímeros solubles en agua ejemplares de acuerdo con la invención incluyen, péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mezcladas y estar compuestos de un aminoácido único, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido ejemplar es el poli(ácido siálico). Un poli(éter) ejemplar es el poli(etilenglicol), por ejemplo, m-PEG. La poli(etilenimina) es una poliamina ejemplar y el poli ácido(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

10 [0026] La estructura polimérica del polímero soluble en agua de acuerdo con la invención, puede ser poli(etilenglicol) (es decir, PEG). El término PEG en conjunto con la presente invención incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG alcoxi, PEG difuncional, PEG de ramas múltiples, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes a la estructura polimérica), o PEG con enlaces degradables.

15 [0027] La estructura polimérica puede ser lineal o ramificada. Las estructuras poliméricas ramificadas son en general conocidas en el arte. Típicamente, un polímero ramificado tiene una porción de núcleo ramificado central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales ligadas al núcleo ramificado central. El PEG es comúnmente usado en formas ramificadas que pueden ser preparadas por adición de óxido de etileno a varios polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La porción ramificada central también puede derivar de varios aminoácidos, tales como lisina o
20 cisteína. En un ejemplo, el poli(etilenglicol) ramificado puede ser representado en forma general como R(-PEG-OH)_m, donde R representa la porción nuclear, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de ramas. Moléculas PEG de ramas múltiples, tales como aquellas descritas en la Patente Estadounidense No. 5,932,462, la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, también pueden ser usadas como la estructura polimérica.

25 [0028] Las Figura 8 muestra un polímero PEG ramificado representativo para uso en modalidades de la invención, denominado en la presente como "SA-glicerol-PEG". La Figura 8A muestra un componente SA-glicerol-PEG ejemplar de CMP-SA-glicerol-PEG o de un SA-glicerol-PEG ligado a un glicano o a un aminoácido de un polipéptido. La Figura 8B muestra la porción SA-glicerol-PEG ligada a un glicano o polipéptido a través de un residuo Gal. La Figura 8C muestra la porción SA-glicerol-PEG ligada a un glicano o polipéptido a través de un residuo Gal-GalNac. La Figura 8D muestra la porción SA-glicerol-PEG ligada a un aminoácido de un polipéptido a través de una porción Gal-GalNac. En varias modalidades, AA es treonina o serina. En una modalidad ejemplar, AA se convierte a un sitio de glicosilación O-ligado por supresión del dominio B del polipéptido FVIII. La discusión con respecto al peso molecular del polímero en el párrafo [0032] a continuación es, en general, aplicable al PEG ramificado mostrado en la Figura 8. En la Figura 8, el índice "n" representa cualquier número entero que proporciona un m-PEG lineal (y de este modo uno ramificado) del peso
30 molecular deseado como se indica en el párrafo [0032]. En varias modalidades, "n" se selecciona de manera que la porción m-PEG lineal es de aproximadamente 20 KDa hasta aproximadamente 40 KDa, por ejemplo, aproximadamente 20 KDa, aproximadamente 30 KDa o aproximadamente 40 KDa. Números enteros que corresponden a estos pesos moleculares m-PEG corresponden a aproximadamente 400 (por ejemplo, aproximadamente 455) hasta aproximadamente 900 (por ejemplo, aproximadamente 910). Por consiguiente, "n" se selecciona para proporcionar un PEG ramificado que es de aproximadamente 40 KDa hasta aproximadamente 80 KDa, por ejemplo, aproximadamente 40 KDa, aproximadamente 50 KDa, aproximadamente 60 KDa, aproximadamente 70 KDa, o aproximadamente 80 KDa.

45 [0029] Muchos otros polímeros hidrofílicos también son adecuados para la invención. Las estructuras poliméricas solubles en agua que no son peptídicas son particularmente útiles en la invención. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen pero no se limitan a otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefinico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli([alfa] - hidroxíácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), tal como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,629,384, así como también copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos.

50 [0030] Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica puede variar, típicamente está en el intervalo desde aproximadamente 100 Da hasta aproximadamente 160.000 Da, tal como por ejemplo, desde aproximadamente 5.000 Da hasta aproximadamente 100.000 Da. Más específicamente, el tamaño de cada polímero hidrofílico conjugado de acuerdo con la presente invención, puede variar desde aproximadamente 500 Da hasta
55 aproximadamente 80.000 Da, tal como por ejemplo, aproximadamente 1.000 Da hasta aproximadamente 80.000 Da; aproximadamente 2.000 Da hasta aproximadamente 70.000 Da; aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 70.000 Da; aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 60.000 Da; aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 70.000 Da; aproximadamente 20.000 hasta aproximadamente 60.000 Da; aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 60.000 Da; aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 50.000 Da; o aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 40.000 Da. Se debe entender que estos tamaños representan estimaciones en lugar de medidas exactas. De acuerdo con una modalidad preferida, las moléculas de acuerdo con la invención son conjugadas con una población heterogénea de polímeros hidrofílicos, tales como, por ejemplo, PEG de un tamaño de, por ejemplo, 10.000, 40.000 u 80.000 Da +/- aproximadamente 5.000, aproximadamente 4.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000 o aproximadamente 1.000 Da.

65 [0031] Oligosacárido O-ligado: Ambos N-glicanos y O-glicanos están unidos a proteínas por las células que producen la

proteína. La maquinaria de N-glicosilación celular reconoce y glicosila señales de N-glicosilación (porciones N-X-S/T) en la cadena de aminoácido, ya que la proteína naciente es traslocada a partir del ribosoma al retículo endoplásmico (Kiely et al. 1976; Glabe et al. 1980).

5 [0032] Del mismo modo, los O-glicanos están unidos a sitios de O-glicosilación específicos en la cadena de aminoácido, pero las porciones que activan la O-glicosilación son mucho más heterogéneas que las señales de N-glicosilación, y la capacidad para predecir sitios de O-glicosilación en secuencias de aminoácido es todavía inadecuada (Julenius et al. 2004). La construcción de sitios de O-glicosilación artificiales está de este modo, asociada con alguna incertidumbre. La presunción general es que la molécula FVIII nativa no contiene ningún sitio de O-glicosilación, y el experto en la técnica
10 podrá esperar por lo tanto, que al menos un sitio de O-glicosilación artificial pueda tener que ser construido e insertado en el dominio B en conjunto con la práctica de la presente invención.

[0033] El oligosacárido O-ligado en un dominio B del Factor VIII B truncado, puede, de este modo, estar ligado de forma covalente a una secuencia de glicosilación O-ligada que se origina naturalmente o una secuencia de glicosilación O-ligada la cual ha sido artificialmente construida por técnicas recombinantes.
15

[0034] Preferentemente el oligosacárido O-ligado está ligado a una secuencia de glicosilación O-ligada que se origina naturalmente, la cual no se expone a glicosilación en la molécula del Factor VIII de tipo nativo, sino que llega a ser accesible a O-glicosilación como una consecuencia de truncación del dominio B. Un ejemplo del mismo se muestra en los ejemplos y en la SEC ID NO 2 (el dominio B truncado corresponde a los aminoácidos 742-763). Es plausible que el sitio de O-glicosilación "escondido" en la SEC ID NO 2 también llegara a ser glicosilado aún si el dominio-B es truncado en un lugar algo diferente, es decir, si el dominio B truncado es algo más corto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos más cortos que la SEC ID NO 2) o más largo (tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 aminoácidos) comparado con la SEC ID NO 2. Este procedimiento a través de la activación un sitio de O-glicosilación "escondido" por truncación de un dominio B en lugar de creación de un sitio de O-glicosilación artificial, tiene la ventaja de crear una molécula con un perfil de seguridad ventajoso (es decir, alergenicidad reducida, etc.). Otros sitios de O-glicosilación en el dominio B del Factor VIII pueden, del mismo modo, llegar a ser activados truncando las moléculas en diferentes formas.
20
25

[0035] Glico-PEGilación de oligosacáridos O-ligados: La biosíntesis de O-glicanos puede ser modificada y terminada relativamente pronto con la adición de residuos de ácido siálico en la biosíntesis. Ciertas enzimas de sialiltransferasa, son capaces de actuar en GalNAc-Ser/Thr o subtipos nucleares O-glicanos tempranos, después de la acción del Núcleo 1 GalT. El término antígeno T se asocia con la presencia del disacárido Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr. La producción de estas estructuras supone una competición entre glicosiltransferasas para el mismo sustrato y, de este modo, los niveles de expresión y distribuciones subcelulares de glicosiltransferasas dentro del aparato de Golgi, determina el resultado estructural en la biosíntesis y diversificación de O-glicano. Como se ilustra en la Figura 1, solamente el disacárido Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr es responsable de glicoPEGilación.
30
35

[0036] Sin embargo, la cantidad disponible de esta estructura puede ser mayormente mejorada a través del tratamiento de la proteína con sialidasa o GalT Nuclear1 o una combinación de la misma. Como un resultado del proceso de glicoPEGilación del ácido Siálico, se agrega PEG a la estructura nativa a través de un enlace α 3 al disacárido Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr de la proteína objetivo (Fig. 1).
40

[0037] Otros polímeros hidrofílicos también pueden ser unidos a oligosacáridos O-ligados. El requerimiento básico para conjugar enzimáticamente otros polímeros hidrofílicos a FVIII por medio del O-glicano es la capacidad para acoplarlos al derivado de ácido glicil-siálico por medio del grupo amino libre como se describe en el documento WO03031464. Esto se puede lograr a través de una gran variedad de químicas de acoplamiento conocidas por aquellos expertos en la técnica. Ejemplos de polímeros biocompatibles activados incluyen óxidos de polialquilenos tales como polietilenglicol sin limitación (PEG), polímeros de 2-(metacrililoxi)etil fosforilcolina (mPC) (como se describe en el documento WO03062290), dextranos, ácidos colomínicos u otros carbohidratos a base de polímeros, polímeros de aminoácidos o de secuencias peptídicas específicas, derivados de biotina, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, anhídrido de ácido co-maléico-polietileno, anhídrido de ácido co-málico-poliestireno, polioxazolona, poli-acriloilmorfolina, heparina, albúmina, celulosas, hidrolizados de quitosán, almidones tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glicógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma de xantano, carragenano, pectina, hidrolizados de ácido alginico, otros bio-polímeros y cualquiera de los equivalentes de los mismos.
45
50
55

[0038] Composición farmacéutica: Una composición farmacéutica en la presente, preferiblemente pretende abarcar composiciones que comprenden moléculas del Factor VIII de acuerdo con la presente invención adecuadas para administración parental, tales como por ejemplo, composiciones estériles listas para usar o composiciones estériles secas, que pueden ser reconstituidas, por ejemplo, en búfer acuoso o agua. Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender varios excipientes, estabilizadores, etc., farmacéuticamente aceptables.
60

[0039] Ingredientes adicionales en tales composiciones pueden incluir agentes humectantes, emulsificadores, antioxidantes, agentes de volumen, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un
65

aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes tradicionales por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad total de la formulación farmacéutica de la presente invención. La administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede ser realizada por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición la cual puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto FVIII en la forma de un atomizador pulmonar o nasal. Como una opción todavía adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto FVIII de la invención también pueden ser adaptadas para administración transdermal, por ejemplo, por inyección libre de jeringa o de un parche, opcionalmente un parche iontoforético o transmucosal, por ejemplo, administración bucal.

[0040] En un primer aspecto, la presente invención de este modo se refiere a una molécula del Factor VIII truncada de dominio B con una vida media circulatoria modificada, dicha molécula es conjugada de forma covalente con un polímero hidrofílico por medio de un oligosacárido O-ligado en el dominio truncado B, donde la activación del Factor VIII (activación de la molécula) conlleva la eliminación del polímero hidrofílico conjugado de forma covalente, donde las porciones de la cadena pesada y ligera del polipéptido precursor de FVIII son separadas por un enlace, donde la secuencia del enlace deriva del dominio B de FVIII y donde el enlace contiene una secuencia de reconocimiento para la proteasa que separa el polipéptido precursor de FVIII truncado del dominio B en la cadena pesada y ligera.

[0041] De acuerdo con una modalidad, el polímero hidrofílico es PEG. El tamaño del polímero PEG puede variar desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 160.000 Da; tal como 10.000 hasta 80.000 Da, tal como por ejemplo, aproximadamente 10.000; 15.000; 20.000; 25.000; 30.000; 35.000; 40.000; 45.000; 50.000; 55.000; 60.000; 65.000; 70.000; 75.000; o 80.000 Da.

[0042] De acuerdo con una modalidad particularmente preferida, la molécula de acuerdo con la presente invención, comprende la secuencia de aminoácido como se expone en la SEC ID NO 2. Tales moléculas tienen una característica única en la cual la molécula FVIII activada es idéntica a la molécula FVIII activa nativa. Esta característica parece tener propiedades ventajosas en valoraciones de seguridad.

[0043] La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de acuerdo con la presente invención.

[0044] La presente invención además se refiere a un método para obtener una molécula de acuerdo con la presente invención, donde el método conlleva conjugar una molécula del Factor VIII truncada de dominio B con un polímero hidrofílico, tal como por ejemplo, un grupo PEG, por medio de oligosacárido O-ligado en el dominio truncado B. Resulta que la presente invención también se refiere a moléculas obtenidas o que se obtienen por tales métodos.

[0045] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad hemofílica que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de acuerdo con las reivindicaciones.

[0046] El término "tratamiento", como se usa en la presente, se refiere a la terapia médica de cualquier humano u otro sujeto animal en necesidad de la misma. Se espera que el sujeto tenga que someterse a examen físico por un practicante médico, quien ha dado un diagnóstico definitivo o tentativo lo cual podría indicar que el uso de dicho tratamiento específico es beneficioso para la salud del humano u otro sujeto animal. El ritmo y propósito del tratamiento puede variar de un individuo a otro, de acuerdo con el *status quo* de la salud del sujeto. De este modo, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.

[0047] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una molécula de acuerdo con la invención como un medicamento.

Breve descripción de las figuras

[0048] En las figuras, el tamaño de los grupos conjugados es denominado algunas veces como "K", lo cual aquí significa ser equivalente a KDa (kilo Dalton).

Figura 1: Esquema de procesos de PEGilación de glicol de oligosacáridos O-ligados. La figura representa una forma posible para llegar a los productos obtenidos en los ejemplos.

Figura 2: Cromatografía de intercambio iónico de la mezcla de reacción en Source 15Q (A). SDS-PAGE con marcadores moleculares (izquierda) de fracción recolectada (B).

Figura 3: Purificación del producto tapado en cromatografía de exclusión de tamaño superdex 200.

Figura 4: Actividad de coagulación de rFVIII O-glicoPEGilado usando varios reactivos aPTT. (A) muestra la relación entre la actividad de coagulación y la actividad cromogénica. (B) muestra la actividad de coagulación específica.

Figura 5: Efectos *in vivo* (tiempo para la oclusión) en ratones KO FVIII KO de 40K-PEG-[O]-N8.

Figura 6: Diagrama de flujo que muestra las etapas de proceso involucradas en la producción del Factor FVIII glicoPEGilado de acuerdo con la invención.

Figura 7: Representación esquemática de una molécula del Factor VIII de acuerdo con la presente invención producida en los Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción del Factor VIII O-glicosilado truncado del dominio B recombinante

[0049] Un ejemplo de la secuencia de aminoácido de una molécula del Factor VIII suprimido del dominio B, se proporciona en la SEC ID NO 2. Este polipéptido también puede ser denominado como "N8". Esta molécula comprende una secuencia enlazadora de 21 residuos de aminoácidos (SFSQNSRHPSQNPVLRHQR - la S subrayada es el residuo de Serina con el O-glicano que es pegilado en el Ejemplo 2).

[0050] Se puede hacer referencia a las moléculas del Factor VIII de acuerdo con la presente invención pueden, en los Ejemplos, de varias formas - pero todas las referencias a las moléculas del Factor VIII se refieren a las moléculas del Factor VIII de acuerdo con la invención o, alternativamente, a moléculas del Factor VIII en el proceso de ser convertidas a moléculas del Factor VIII de acuerdo con la invención.

SEC ID NO 2:

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFNFNTSVVYKKTFLVFEFTDHLFNIA
 KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK
 EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG
 LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFL
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFI
 QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFM
 AYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKES
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYV
 FDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM MEN
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSR
 HPSQNPVLRHQRREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRH
 YFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVQFKKVVVFQEF T DGSFTQPLYRGELNEHLGLL
 GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNFVKNETKTYFWKVQH
 HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGLPLVCHTNTLNP AHGRQVTVQEFALFFTIF
 DETKSWYFTENMERNCRAPCNIMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
 LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHL
 HAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPF
 SWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVD
 SSGIKHNIFNPIIARYIRLHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFT
 NMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT TQGVKSLTSMY
 VKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIAL
 RMEVLGCEAQDLY

Proceso de cultivo y línea celular:

[0051] Usando el ADNc del Factor VIII, se construyó un plásmido de expresión de mamífero que codifica el Factor VIII suprimido del dominio B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO. 2. El plásmido es la cadena pesada del Factor VIII codificante que comprende el aminoácido 1-740 del Factor VIII humano de longitud completa y la cadena ligera del Factor VIII que comprende el aminoácido 1649-2332 del Factor VIII humano de longitud completa. Las secuencias de cadena ligera y pesada están conectadas por un enlazador de 21 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos 741-750 y 1638-1648 del Factor VIII humano de longitud completa. Las células de ovario de hámster Chino (CHO) se transfectaron con el plásmido codificante del Factor VIII de BDD y se seleccionaron con el sistema de reductasa dihidrofolato eventualmente conduciendo a la célula productora de suspensión clonal cultivada en medio libre de componente animal.

[0052] La primera etapa en el proceso es la inoculación de un vial de célula, a partir de un vial de banco de célula funcional, en un medio de crecimiento libre de componente animal y químicamente definido. Inicialmente después del cebado, las células son incubadas en un matraz-T. Uno o dos días después del cebado, las células son transferidas a un matraz sacudidor, y el volumen de cultivo es expandido por diluciones sucesivas para mantener la densidad celular entre $0,2 - 3,0 \times 10^6$ células/ml. La siguiente etapa es la transferencia del cultivo del matraz sacudidor en biorreactores sembrados. El volumen del cultivo aquí además es expandido antes de la transferencia final al biorreactor de producción. El mismo medio libre de componente animal y químicamente definido se usa para todas las etapas de expansión del inoculo. Después de la transferencia al biorreactor de producción, el medio es suplementado con componentes que incrementan la concentración del producto. En el biorreactor de producción las células son cultivadas en un proceso por lotes repetido en un tiempo de ciclo de tres días. En la recolección, 80 – 90 % del volumen de cultivo se transfieren a un tanque de recolección. El fluido de cultivo restante es entonces diluido con medio fresco, para obtener la densidad celular inicial, y después se inicia un nuevo periodo de crecimiento.

[0053] El lote recolectado es clarificado por centrifugación y filtración y transferido a un tanque de retención antes del inicio del proceso de purificación. Se agrega un búfer a la recolección libre de célula en el tanque de retención para estabilizar el pH.

[0054] Al final del funcionamiento de producción, las células son recolectadas y congeladas, con el fin de poner fin al banco de producción de células. Este banco de células se somete a pruebas para determinación de micoplasma, esterilidad y contaminación viral.

Purificación:

[0055] Para el aislamiento del Factor VIII suprimido del dominio B a partir del medio de cultivo celular, se usó una cuarta etapa de procedimiento de purificación que incluye una etapa de concentración sobre una columna Capto MMC, una etapa de cromatografía inmunoabsorbente, una cromatografía de intercambio aniónico y finalmente una etapa de filtración en gel. Típicamente, se usó el siguiente procedimiento: 11 litros de medio filtrado estéril se bombearon sobre la columna (1,6 x 12 cm) de Capto MMC (GE Healthcare, Sweden) equilibrados en búfer A: 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 50 mM de NaCl, 0,02 % de Tween 80, pH = 7,5 a un flujo de 15 ml/min. La columna se lavó con 75 ml de búfer A, seguido por lavado con 75 ml de búfer A que contiene 1,5 M de NaCl. La proteína se eluyó con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02 % de Tween 80, 2,5 M de NaCl, 8 M de etilenglicol, pH = 7,5 a un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 8 ml y se sometieron a ensayo para actividad del Factor VIII (prueba CoA). Las fracciones que contienen el Factor VIII se combinaron y se obtuvo normalmente un volumen de combinación de aproximadamente 50 ml.

[0056] Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal contra el Factor VIII (Kjalke Eur J Biochem 234 773). Por mapeo de epítipo (resultados no mostrados) se descubrió que este anticuerpo, F25, reconocía la secuencia C-terminal lejana de la cadena pesada del residuo de aminoácido 725 a 740. El anticuerpo F25 se acopló a Sefarosa 4 FF activada por NHS (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) a una densidad de 2,4 mg por ml de gel, esencialmente como se describe por el fabricante. La combinación de la etapa previa se diluyó 10 veces con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02 % de Tween 80, pH = 7,3 y se aplicó a la columna Sefarosa F25 (1,6 x 9,5 cm) equilibrada con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 150 mM de NaCl, 0,02 % de Tween 80, 1 M de glicerol pH = 7,3 a un flujo de 0,5 ml/min. La columna se lavó con búfer de equilibrio hasta que la señal UV fue constante y después con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,65 M de NaCl, pH = 7,3 hasta que la señal UV fue constante nuevamente. El Factor VIII se eluyó con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02 % de Tween 80, 2,5 M de NaCl, 50 % de etilenglicol, pH = 7,3 a un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml y sometieron a ensayo para actividad del Factor VIII (prueba CoA). Se combinaron las fracciones que contienen el Factor VIII y se obtuvo normalmente un volumen de combinación de aproximadamente 25 ml.

[0057] Un búfer A: 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02 % de Tween 80, 1 M de glicerol, pH = 7,3 y un búfer B: 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02 % de Tween 80, 1 M de glicerol, 1 M NaCl, pH = 7,3 se preparó para la etapa de intercambio iónico. Una columna (1 x 10 cm) de Soporte Macro-Prep 25Q (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) se equilibró con 85 % de búfer A/15% de búfer B a un flujo de 2 ml/min. La combinación de la etapa previa se diluyó 10 veces con el búfer A y bombeó sobre la columna con un flujo de 2 ml/min. La columna se lavó con 85 % de búfer A/15 % de búfer B a un flujo de 2 ml/min y el Factor VIII se eluyó con un gradiente lineal de 15 % de búfer B a 70 % de búfer B sobre 120 ml a un flujo de 2 ml/min. Se recolectaron fracciones de 2 ml y se sometieron a ensayo para actividad del Factor VIII (prueba CoA). Se combinaron las fracciones que contienen el Factor VIII y se obtuvo normalmente un volumen de combinación de aproximadamente 36 ml.

[0058] La combinación de la etapa previa se aplicó a una columna de grado de preparación, Superdex 200, (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) (2,6 x 60 cm) equilibrada y eluida a 1 ml/min con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02 % de Tween 80, 1 M de glicerol, 150 mM de NaCl, pH = 7,3. Se recolectaron fracciones de 3 ml y se sometieron a ensayo por actividad del Factor VIII (prueba CoA). Se combinaron las fracciones que contienen el Factor VIII y se obtuvo normalmente un volumen de combinación de aproximadamente 57 ml. La combinación que contiene el Factor VIII se almacenó a -80°C.

[0059] Con el uso del procedimiento de purificación de cuatro etapas anterior, se obtuvo un rendimiento total de aproximadamente 15 % como se juzga por actividad CoA y mediciones ELISA.

5 [0060] La línea celular usada para la manufactura de N8 es una línea de células de ovario de hámster Chino recombinante (CHO), establemente transfectada con el plásmido de expresión #814 F8-500 en pTSV7 que consta del vector de expresión pTSV7 con un inserto que contiene ADNc que codifica la proteína F8-500. "N8" aquí se refiere a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos listados en la SEC ID NO 2. Partiendo del N-término, la proteína F8-500 (N8) consta del péptido señal FVIII (aminoácidos 19 a 1), seguido por la cadena pesada FVIII sin el dominio B (aminoácidos 1-740), un enlazador de 21 aminoácidos (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR), y la cadena ligera de FVIII (aminoácidos 1649-2332 de FVIII humano de tipo nativo). La secuencia enlazadora de 21 aminoácidos se deriva del dominio B de FVIII y consiste de aminoácidos 741-750 y 1638-1648 de FVIII de longitud completa.

15 [0061] Se transfectaron células CHO con 814 F8-500 en pTSV7 y se seleccionaron en el sistema de dihidrofolato reductasa, eventualmente conduciendo a una célula productora de suspensión clonal cultivada en un medio libre de componente animal. Se inició una puesta a marcha de producción cebando un vial de banco celular funcional y se expandieron las células hasta transferencia a un biorreactor de producción. Se usó el mismo medio libre de componente animal y químicamente definido para todas las etapas de expansión de inóculo. Después de la transferencia al biorreactor de producción, el medio se suplementó con componentes que incrementan la concentración del producto. En el biorreactor de producción, las células se cultivaron en un proceso por lotes repetido en un tiempo de ciclo de tres días. En la recolección, 80 - 90% del volumen de cultivo se transfieren a un tanque de recolección. El fluido de cultivo restante es entonces diluido con medio fresco, para obtener la densidad celular inicial, y después se inicia un periodo de nuevo crecimiento. El lote recolectado es clarificado por centrifugación y filtración y transferido a un tanque de retención antes del inicio del proceso de purificación. Se agrega un búfer a la recolección libre de células en el tanque de retención para estabilizar el pH.

25 **Ejemplo 2**

PEGilación de dominio B recombinante truncado y Factor VIII O-glicosilado:

30 [0062] Las moléculas recombinantes del Factor VIII obtenidas en el Ejemplo 1 son conjugadas con polietilenglicol (PEG) usando el siguiente procedimiento:

35 [0063] Para la glicoPEGilación del Factor VIII recombinante se prefieren moléculas obtenidas en el Ejemplo 1 por ser eficientes a concentración de FVIII > 5 mg/ml. Puesto que el FVIII no es normalmente soluble a la concentración, se condujo una proyección de composiciones amortiguadoras seleccionadas (véase algunos de estos resultados en la tabla 1).

40 [0064] Basados en estas consideraciones, un búfer que contiene 50 mM de MES, 50 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 20 % de glicerol, pH 6,0, se encontró por ser un búfer de reacción adecuado.

Tabla 1 Evaluación de impacto de condiciones de reacción en agregación y solubilidad de FVIII

| Composición de búfer de reacción | Precipitado | % de Agregado |
|---|-------------|---------------|
| 10 mM de Histidina, 260 mM de Glicina, 1 % de Sacarosa, 10 mM de CaCl ₂ | SÍ | n.d. |
| 50 mM de HEPES, 10 mM de CaCl ₂ , 150 mM de NaCl, pH 7; | SÍ | n.d. |
| 50 mM de MES, 10 mM de CaCl ₂ , 150 mM de NaCl, pH 6,0 | SÍ | n.d. |
| 50 mM de MES, 50 mM de CaCl ₂ , 150 mM de NaCl, pH 6,0 | NO | 8 |
| 50 mM de MES, 50 mM de CaCl ₂ , 150 mM de NaCl, 10 % de glicerol, pH 6,0 | NO | S |
| 50 mM de MES, 50 mM de CaCl ₂ , 150 mM de NaCl, 20 % de glicerol, pH 6,0 | NO | 1,0-1,7 |

45 [0065] El FVIII recombinante, el cual ha sido purificado como se describe anteriormente, se concentró en amortiguador de reacción ya sea por intercambio iónico en una columna HQ Poros 50 usando etapa de elución, en un filtro Sartorius Vivaspin (PES), valor límite 10 kDa en un filtro Amicon de 10 kDa MWCO PES a una concentración de 6-10 mg/mL. La glicoPEGilación de FVIII se inició mezclando el Factor VIII (BDD) (~4,7 mg/mL final) con Sialidasa (*A. urifaciens*) (159 mU/mL), CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (5 eq.mol.) y MBP-ST3Gall (540 mU) en búfer de reacción (50 mM de MES, 50 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 20 % de glicerol, 0,5 mM de antipaina, pH 6,0). La mezcla de reacción se incubó a 32° C hasta un rendimiento de conversión de ~20-30 % del total.

50 [0066] Después de la incubación, la muestra se diluyó con Búfer A (25 mM de Tris, 5 mM de CaCl₂, 20 mM de NaCl, 20

% de glicerol, pH 7,5) y se aplicó sobre una columna 15Q (1cm id x 6 cm, 4,7 mL, 1 mL/min, 280 nm). El material unido se lavó con Búfer A y se eluyó usando un gradiente de etapa con Búfer B (25 mM de Tris, 5 mM de CaCl₂, 1 M de NaCl, 20 % de glicerol, pH 7,5). El Factor VIII GlicoPEGilado-(O)-SA-glicerol-PEG-40 kDa se eluyó de la columna a ~25 % de Búfer B. La Figura 2 muestra la cromatografía de intercambio iónico de la mezcla de reacción en Source 15Q.

[0067] Para bloquear porciones libres de galactosa las cuales han sido expuestas a los N-glicanos durante el tratamiento de sialidasa, la fracción combinada del Factor VIII-SA-glicerol-PEG-40 kDa (1,0 mg/mL final) se mezcló con CMP-SA (2.000 mol eq) y MBP-SBD-ST3Gal3 (400 mU/mL) en búfer de reacción 50 mM de MES, 20 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 10 mM de MnCl₂, 20 % de glicerol, pH 6,0 y se incubó a 32° C durante 11 horas.

[0068] El Factor VIII glicoPEGilado-SA-glicerol-PEG-40 de kDa tapado se separó de CMP-SA y ST3GalIII por filtración en gel en una columna Superdex 200 (10 cm id x 300 mm; 280 nm) equilibrada con 50 mM de MES, 50 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 10 % de glicerol, pH 6,0; velocidad de flujo de 0,25 mL/min. El Factor VIII-SA-glicerol-PEG-40 de kDa del producto eluye a los 38 min. La Figura 3 muestra la purificación del producto tapado usando cromatografía de exclusión de tamaño Superdex 200. La fracción pico se recolectó, se alicuotó y se sometió a análisis subsecuente.

[0069] El propósito del procedimiento de tapado es reducir la separación *in vivo* de la molécula conjugada del Factor VIII.

Ejemplo 3

Actividad de rFVIII PEGilado de O-glicano en ensayo de actividad cromogénica de FVIII:

[0070] La actividad del rFVIII O-glicoPEGilado obtenida en el Ejemplo 2 se evaluó en un ensayo cromogénico de FVIII usando reactivos Coatest SP (Chromogenix) como sigue: muestras de rFVIII y calibrador (el 7mo. Estándar FVIII internacional de NIBSC), se diluyeron en búfer de ensayo Coatest (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 % de BSA, pH 7,3, con preservativo). Se agregaron cincuenta µl de muestras, estándares y control negativo de búfer a placas microtituladoras de 96 cavidades (Nunc) por duplicados. Se mezclaron el reactivo del Factor IXa/Factor X, el reactivo de fosfolípido y CaCl₂ del kit Coatest SP 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 µl de estos se agregaron a las cavidades. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 50 µl de la mezcla 1-2581 de inhibidor de trombina/S-2765 de sustrato del Factor Xa, y las reacciones se incubaron 10 min a temperatura ambiente antes de que se agregaran 25 µl de ácido cítrico 1 M, pH 3. La absorbancia a 415 nm se midió en un lector de placa microtituladora Spectramax (Molecular Devices) con absorbancia a 620 nm, usada como longitud de onda de referencia. El valor para el control negativo se sustrajo de todas las muestras y se preparó una curva de calibración por regresión lineal de los valores de absorbancia contra la concentración de FVIII. La actividad específica se calculó dividiendo la actividad de las muestras con la concentración de proteína determinada por HPLC de exclusión de tamaño e integrando el pico de cadena ligera en el cromatograma de HPLC, es decir, la porción PEG no se incluyó. Los datos en la Tabla 2 demuestran que la actividad cromogénica específica se mantuvo para los compuestos rFVIII O-glicoPEGilados, esto significa que la actividad del Factor VIII parece ser retenida en las variantes PEGiladas.

Tabla 2. Actividad cromogénica específica de rFVIII O-glicoPEGilado con diferentes tamaños de grupos PEG.

| Compuesto rFVIII | Actividad cromogénica específica (IU/mg) |
|----------------------|--|
| rFVIII | 11819±727 (5) |
| 10KDa-PEG-[O]-rFVIII | Aprox. 8331 (1) |
| 40KDa-PEG-[O]-rFVIII | 9760 ± 886 (8) |
| 80KDa-PEG-[O]-rFVIII | 12129 ± 2643 (3) |

Los datos son desviaciones medias y estándares de los números de determinaciones independientes indicadas en paréntesis.

Ejemplo 4

Actividad de rFVIII Pegilado de O-glicano en ensayo de actividad de coagulación del FVIII

[0071] La actividad del rFVIII O-glicoPEGilado se evaluó además en el ensayo de coagulación del FVIII. Las muestras de rFVIII se diluyeron en HBS/BSA (20 mM de hepes, 150 mM de NaCl, pH 7,4 con 1 % de BSA) a aproximadamente 10 U/ml, seguido por 10 partes de dilución en plasma deficiente en FVIII que contiene VWF (Dade Behring). Las muestras y un plasma calibrado estándar (HemosIL Calibration Plasma de Instrumentation Laboratory), se diluyeron subsecuentemente en HBS/BSA a cuatro (muestras) o seis (calibrador) concentraciones diferentes. El tiempo de coagulación se midió en un instrumento ACL9000 (Instrumentation laboratory) usando el programa de factor individual, donde las muestras/estándares se mezclaron con volúmenes iguales de plasma deficiente en FVIII con VWF (Dade Behring), calcio y reactivos aPTT, y se midió el tiempo de coagulación. Como reactivos, se usaron los siguientes: Synthasil (HemosIL, Instrumentation Laboratory), Actina FS (Activated PTT Reagent, Dade Behring) Stago (STA® PTT-

A, Stago), y dAPPTin (DAPPTIN®TC, Technoclone). Las actividades de las muestras se calcularon con base en un trazo semi-log de tiempo de coagulación contra la concentración del calibrador.

[0072] La actividad de coagulación (fig. 4) de los compuestos de rFVIII O-glicoPEGilados (control, 10, 40, y 80 kDa de PEG, respectivamente) se redujeron a varias extensiones dependiendo del tamaño de PEG y los reactivos aPTT usados. Usar Synthasil o dAPPTin como reactivos aPTT resultó en una reducción gradual en la actividad de coagulación con el tamaño de PEG. Con reactivo aPTT de Stago, se observó 50 % inferior actividad de coagulación específica para los tres compuestos O-glicoPEGilados N8 evaluados. Cuando se usó Actin FS como un reactivo aPTT, se mantuvo una actividad de coagulación específica de aproximadamente 10.000 IU/mg. Los datos indican que el ensayo aPTT está influenciado por la presencia de una porción PEG, sin embargo, usar reactivos aPTT seleccionados por ejemplo, Actin FS, la actividad de coagulación específica de rFVIII no se deteriora después de la O-glicoPEGilación.

Ejemplo 5:

15 *Efecto de PEGilación O-ligada de rFVIII en actividad del co-factor y velocidad de activación de FVIII*

[0073] La incorporación de FVIII activada en el complejo FIXa-FVIIIa mejora la eficiencia catalítica de cinco órdenes de magnitud de activación de FX catalizada por FIXa (van Dieijen et al. (1981) J Biol Chem 256:3433) y caracterización del montaje del complejo FIXa-FVIIIa y cinética de activación de FX, es una medida sensible de la integridad funcional de moléculas de FVIIIa. La actividad del co-factor de rFVIII o PEG-rFVIII activada por trombina se caracterizó determinando los parámetros de cinética de activación FX catalizada por FIXa en presencia de fosfolípidos y rFVIII o PEG-rFVIII activados por trombina. Usando el ensayo de actividad FVIIIa (ensayo de actividad del cofactor FIXa), se realizaron titulaciones recíprocas de FIXa y FVIIIa contra una concentración fija (0,1 nM) de rFVIIIa o FIXa, respectivamente, para obtener afinidad aparente de FIXa para rFVIIIa ($K_{1/2FIXa}$) y concentración funcional FVIIIa. La constante Michaelis (k_m) y número de cambios (k_{cat}) de activación FX se obtuvieron a partir de titulaciones de FX contra una concentración fija de complejo FIXa-FVIIIa.

[0074] Se llevaron a cabo ensayos de actividad del cofactor FIXa como sigue: se prepararon variantes de rFVIII y PEG-rFVIII activadas por trombina recientemente para cada prueba incubando rFVIII (normalmente 0,7 nM, 1 U/mL) con 5 nM de α -trombina humana durante exactamente 30 segundos a 37° C. Subsecuentemente, la velocidad de activación FX se cuantificó muestreando la reacción de activación anterior en una mezcla preparada de FIXa, vesículas fosfolípicas (Phospholipid TGT de Rossix [Mölnadal, Sweden]), hirudina, Pefabloc Xa y CaCl₂; la activación de FX se inició por adición de FX y se dejó proceder por ya sea 30 segundos o 60 segundos a 37° C. La activación se detuvo por dilución de la reacción de activación de FX en búfer enfriado en hielo que contiene EDTA. Usando un sustrato cromogénico específico de FXa, la concentración de FXa se cuantificó leyendo la absorbancia a 405 nM en un lector ELISA. Una curva de referencia preparada usando FXa purificado se usó para convertir la absorbancia a concentración de FXa. El número de cambios de complejos FIXa-rFVIIIa montados de variantes rFVIII o PEG-rFVIII activadas, se usó para convertir la velocidad de activación FX a concentración de rFVIIIa.

[0075] La velocidad de activación de rFVIII catalizada por trombina se midió cuantificando la formación inicial (0 a 3 min) de rFVIIIa en una mezcla que contiene 0,7 nM de rFVIII o PEG-rFVIII y 0,13 nM humano de α -thrombina. La formación de FVIIIa fue lineal en el tiempo. La velocidad de activación de FVIIIa se expresó como manchas de rFVIIIa formadas minuto por mancha de rFVIII inicialmente presente ($v/[rFVIII]_0$).

[0076] La glicoPEGilación O-ligada de rFVIII no afectó la velocidad de activación de rFVIII catalizada por trombina o el k_m o k_{cat} de activación catalizada por FIXa de FX en la presencia de rFVIII activado (véase Tabla 3). Además, la glicoPEGilación O-ligada no afectó el K_d aparente de la interacción rFVIIIa-FIXa ($K_{1/2FIXa}$).

[0077] La Figura 4 muestra la actividad de coagulación de rFVIII O-glicoPEGilado usando varios reactivos aPTT. Los datos se muestran como la relación entre la actividad de coagulación y la actividad cromogénica (A) o como la actividad de coagulación específica (B). Se muestran desviaciones estándares y medias de valores de tres experimentos independientes.

Tabla 3: Relación de activación de rFVIII y constantes cinéticas de activación de FX por FIXa

| Molécula FVIII | Relación de activación de FVIII $10^{-3} \times \text{min}^{-1}$ | $K_{1/2FIXa}$ nM | Activación FX | |
|--------------------|---|---------------------|---------------|------------------------------|
| | | | K_m nM | k_{cat} s^{-1} |
| rFVIII | 10,4±1,9 | 0,88±0,46 | 7,9±1,7 | 4,5±1,9 |
| 40K-PEG-[O]-rFVIII | 9,9±3,8 | 0,42±0,02 | 6,4±0,8 | 4,7±0,2 |
| 80K-PEG-[O]-rFVIII | 9,8±3,4 | 1,11±0,12 | 8,2±0,6 | 3,7±0,4 |

Los datos son desviaciones medias y estándares de las medidas 3-6

Ejemplo 6

Farmacocinéticas de (BDD)-FVIII suprimido de dominio B glicoPEGilado en ratones KO FVIII y ratones KO vWF

5 [0078] Las farmacocinéticas de BDD-FVIII glicoPEGilado con varios tamaños de PEG se estudiaron siguiendo la administración i.v. de 280 IU/kg a ratones KO FVIII.

10 [0079] Se estudiaron los siguientes compuestos: BDD-FVIII, BDD-FVIII -10K PEG (O-glicano, 0129-0000-1005), BDD-FVIII-40K PEG (O-glicano, 0129-0000-1003), BDD-FVIII-2x40K PEG (O y N-glicano 0129-0000-1008-1A), BDD-FVIII-80K PEG (N-glicano, 0129-0000-1012, O-glicano 0129-0000-1009).

Diseño de estudios animales:

15 [0080] Ratones agénicos del Factor VIII (KO FVIII) se criaron en Taconic M&B, basados en un exón 16 KO en antecedente C57B1/6. Se empleó una mezcla de machos y hembras (app.1:1) con un peso aproximado de 25 g y un intervalo de edad de 19-26 semanas. Los ratones no fueron completamente retro-cruzados. No se detectó FVIII en esta cepa de ratón.

20 [0081] Los ratones recibieron inyecciones i.v individuales de 280 IU/kg en la vena de la cola con los compuestos listados anteriormente. Si un ratón fue dosificado peri-venosamente, el ratón se intercambiò con otro ratón. Después de la dosificación, se recolectaron muestras de sangre del plexo orbital a partir de la predosis hasta 64 horas después de la dosificación usando tubos de vidrio capilar no revestidos. Se tomaron tres muestras de cada ratón y se recolectaron 2, 3 o 4 muestras en cada punto de tiempo. Se estabilizó la sangre en citrato de sodio (9:1) y se diluyó en búfer SP FVIII COA (1:4) antes de la centrifugación por 5 minutos a 4000 g. El plasma obtenidos de la sangre diluida se congeló en hielo seco y se mantuvo a -80° C antes del análisis cuantitativo por medio de actividad cromogénica de FVIII y/o análisis del antígeno de FVIII.

25

Análisis de plasma cuantitativo:

30 [0082] Se determinó la actividad cromogénica de FVIII por el uso de reactivos a partir del kit Coatest SP (Chromogenix). Muestras diluidas de plasma, calibradores (plasma de calibración ILS) en búfer Coatest SP y el control negativo de búfer (50 µl) se agregaron a placas microtituladoras de 96 cavidades (Nunc) por duplicados. Se mezclaron el reactivo del Factor IXa/Factor X, el reactivo de fosfolípido y CaCl₂ del kit Coatest SP: 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 µl de esto se agregaron a las cavidades. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 50 µl de mezcla de S-2765 de sustrato del Factor Xa/1-2581 de inhibidor de trombina, y las reacciones se incubaron 10 min a temperatura ambiente antes de que se agregaran 25 µl de ácido cítrico al 2 %. La absorbancia a 405 nm se midió en un lector de placa microtituladora Spectramax (Molecular Devices). Se calculó la actividad FVIII en las muestras de plasma a partir de la curva de calibración hecha por diluciones del estándar de plasma internacional calibrado (ILS):

35

40 [0083] El antígeno de ensayo fue un kit ELISA comercial disponible de Diagnostica Stago (Asserachrom VII:CAg), usando dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cadena ligera de FVIII humano. Los calibradores (diluciones de los compuestos) o muestras de plasma se diluyeron al menos 50 veces en búfer de dilución SP coatest suministrado por el kit se aplicaron a las cavidades prevestidas y se realizó ELISA de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Los valores usados para reportar el estudio de farmacocinética se basan en la curva estándar hecha a partir de los compuestos mismos.

45

Estimaciones de parámetros de farmacocinética:

50 [0084] Se llevó a cabo análisis de farmacocinética por métodos no compartamentales (NCA) de datos usando ILS como calibrador (datos basados en actividad cromogénica), usando los compuestos mismos como calibrador (datos basados en ELISA). A partir de los datos, se estimaron los siguientes parámetros: C_{max} (concentración máxima, después de la administración i.v., esta es en el primer punto de tiempo de muestreo), T_{max} (tiempo de concentración máxima, después de la administración i.v., esta es en el primer punto de tiempo de muestreo), AUC_{0-∞} (área bajo la curva a partir del tiempo 0 a infinito), T_{1/2}, (vida media terminal), CL (separación) y V_{ss} (volumen de distribución en estado listo). Todos los cálculos se realizaron usando WinNonlin Pro versión 4.1.

55

60 [0085] Después de la inyección i.v. de 280 IU/Kg BDD-FVIII, BDD-FVIII-10KDa PEG, BDD-FVIII-40KDa PEG, BDD-FVIII-2x40KDa PEG y BDD-FVIII-80KDa PEG a ratones KO FVIII, la vida media incrementa junto con incremento en tamaño de PEG en el intervalo de 7,8 h (DD-FVIII) a 15-16 h (Tabla 4), el cual corresponde a un incremento de 2 veces. De manera similar, la separación se redujo y el MRT incrementó con los tamaños de PEG incrementados (Tabla 4).

Tabla 4: Parámetros de farmacocinética estimados de FVIII glicoPEGilado con diferentes tamaños de PEG después de la administración i.v. a ratones KO FVIII basados en actividad cromogénica (BDD: dominio B suprimido).

| Compuesto | Dosis (IU/kg) | T _½ (h) | CL (ml/h/kg) | MRT (h) | Prolongación (veces) |
|---------------------------------|---------------|--------------------|--------------|---------|----------------------|
| BDD-FVIII | 280 | 6,7-9,3 | 8,1-10 | 9,9-11 | 1 |
| BDD-FVIII 10KDa PEG (O-glicano) | 280 | 10 | 8,5 | 16 | 1,3 |
| BDD-FVIII-2x40KDa PEG | 280 | 13 | 5,8 | 19 | 1,9-2,1 |
| BDD-FVIII 40KDa PEG (O-glicano) | 280 | 15-16 | 3,6-3,8 | 20-22 | 1,7 |
| BDD-FVIII 80KDa PEG (O-glicano) | 280 | 15 | 6,4 | 21 | 1,9 |

Conclusión:

5

[0086] La GlicoPEGilación de BDD-FVIII incrementa el T_½ 1,3-2,1 veces comparado con el BDD-FVIII después de la administración i.v. de 280 IU/kg a ratones KO FVIII. Se observó un incremento de T_½ ya que el tamaño del grupo PEG se incrementó en el intervalo de 10KDa a 80KDa PEG.

10

Ejemplo 7

Efecto hemostático prolongado de 40K-PEG-[O]-N8 comparado con Advate en un modelo de lesión inducida por FeCl3 en ratones con hemofilia A

15

[0087] La duración de acción de 40K-PEG-[O]-N8 contra FVIII recombinante (Advate) se investigó en un modelo de lesión inducido por FeCl3 en ratones con hemofilia A (F8-KO).

20

[0088] Los ratones fueron anestesiados y se colocaron en una almohadilla de calentamiento (37° C) para mantener la temperatura corporal. La arteria carótida se expuso a una sonda de flujo (0.5PSB Nanoprobe) que mide el flujo sanguíneo por ultrasonido se colocó alrededor de la arteria. La lesión (una oxidación química mediada por hierro) se indujo aplicando un papel filtro (2 x 5 mm) brevemente remojado en una solución de FeCl3 al 10 % alrededor de la arteria carótida expuesta. El papel filtro se removió después de 3 minutos. La arteria entonces se lavó tres veces con NaCl al 0,9 % y finalmente se aplicó Surgilube (un acoplador acústico) para desplazar aire en la sonda de flujo y asegurar una medición optimizada del flujo sanguíneo. El flujo sanguíneo (ml/min) se registró durante 25 minutos después de la eliminación del papel filtro saturado FeCl3 y el tiempo de oclusión se determinó midiendo el tiempo (en min) de eliminación del papel filtro saturado FeCl3 hasta que el flujo de sangre fue 0 ml/min. Si la oclusión no ocurre después de 25 min, el tiempo de oclusión se reporta como 25 min aunque no haya ocurrido oclusión durante el periodo de observación. Se trataron ratones F8-KO (n = 6-10) con Advate (280 U/kg), 40K-PEG-[O]-N8 (280 U/kg), o vehículo. La lesión inducida por FeCl3 se hizo 5 min (efecto agudo) o 24, 48, 60, y 72 horas después de la dosificación. El flujo sanguíneo (ml/min) se registró por 25 min después de la eliminación de FeCl3, y subsecuentemente se determinó el tiempo de oclusión.

25

30

35

[0089] No tuvo lugar oclusión en el ratón F8-KO tratado con vehículo, mientras que la oclusión tuvo lugar en todos los ratones tratados con 40KDa-PEG-[O]-N8 y Advate, 5 minutos después de la dosificación (efecto agudo) con un tiempo de oclusión medio de 4,3±0,4 min y 5,2±0,7 min, respectivamente. En ratones F8-KO tratados con 40KDa-PEG-[O]-N8, el tiempo de oclusión promedio aumentó a 13,8±3,4 min a 72 horas después de la dosificación. Por el contrario, ratones F8-KO tratados con Advate tienen un tiempo de oclusión de 13,0±3,4 min y 15,9±2,9 min después de 24 y 48 horas, respectivamente. De manera importante, no se observaron oclusiones 60 y 72 horas después de la administración de Advate. En todos los ratones tratados con 40KDa-PEG-[O]-N8, se observó oclusión 24 horas después de la dosificación, mientras solamente el 67 % de los ratones tratados con Advate se ocluyeron. Después de 72 horas, la oclusión todavía se observaba en el 63 % de los ratones tratados con 40KDa-PEG-[O]-N8, mientras que no se observó la oclusión 50 y 72 horas después de la administración de Advate.

40

45

Efecto prolongado de 40KDa-PEG-[O]-N8 en ratones F8-KO.

50

[0090] Se hizo una lesión inducida por FeCl3 5 min (efecto agudo), 24, 48, 60, y 72 horas después de la dosificación de 280 IU/kg 40KDa-PEG-[O]-N8, 280 IU/kg Advate, o vehículo. Se registró el flujo sanguíneo (ml/min) por 25 minutos después de la eliminación de FeCl3, y se determinó subsecuentemente el tiempo hasta la oclusión. A las 60 y 72 horas después de la dosificación, no ocurrió oclusión en ratones dosificados con Advate. Se muestra la media y SEM de 6-10 ratones por grupo. El tiempo hasta la oclusión entre los diferentes grupos se comparó usando la prueba Kruskal-Wallis que incluye la post-prueba Dunn *:p<0.05; **:p<0.01.

[0091] En conclusión, el efecto hemostático de 40KDa-PEG-[O]-N8 es significativamente prolongado comparado con Advate en un modelo de lesión inducida por FeCl3 en ratones F8-KO.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Novo Nordisk A/S
DeFrees, Shawn

<120> Moléculas Conjugadas del Factor VIII

10 <130> 101961-5191WO

<140>
<141> 2009-02-25

15 <150> US 61/032,006
<151> 2008-02-27

<150> US 61/043,354
<151> 2008-04-08

20 <150> US 61/058,869
<151> 2008-06-04

<160> 2

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2332
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 35 | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | Met | Gln | Ser | Asp | Leu | Gly | Glu | Leu | Pro | Val | Asp | Ala | Arg | Phe | Pro | Pro | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 40 | Arg | Val | Pro | Lys | Ser | Phe | Pro | Phe | Asn | Thr | Ser | Val | Val | Tyr | Lys | Lys | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | Thr | Leu | Phe | Val | Glu | Phe | Thr | Asp | His | Leu | Phe | Asn | Ile | Ala | Lys | Pro | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 45 | Arg | Pro | Pro | Trp | Met | Gly | Leu | Leu | Gly | Pro | Thr | Ile | Gln | Ala | Glu | Val | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| | Tyr | Asp | Thr | Val | Val | Ile | Thr | Leu | Lys | Asn | Met | Ala | Ser | His | Pro | Val | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 50 | Ser | Leu | His | Ala | Val | Gly | Val | Ser | Tyr | Trp | Lys | Ala | Ser | Glu | Gly | Ala | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| 55 | Glu | Tyr | Asp | Asp | Gln | Thr | Ser | Gln | Arg | Glu | Lys | Glu | Asp | Asp | Lys | Val | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |

ES 2 476 690 T3

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140
 5 Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160
 His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 10 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205
 15 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 20 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 25 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 30 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300
 35 Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320
 Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335
 40 Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 45 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

ES 2 476 690 T3

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400
 5 Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430
 10 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 15 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 20 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 25 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 30 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 35 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 40 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 45 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640

ES 2 476 690 T3

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 5 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 10 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 15 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735
 Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
 740 745 750
 20 Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765
 Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780
 Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800
 30 His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815
 Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830
 35 Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 45 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895

ES 2 476 690 T3

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910
 5 Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925
 Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940
 10 Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960
 Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
 965 970 975
 15 Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020
 25 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050
 30 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065
 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080
 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095
 40 Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110
 Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125
 45 Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | Leu | Ser | Glu | Lys | Asn | Lys | Val | Val | Val | Gly | Lys | Gly | Glu | Phe | Thr |
| | 1145 | | | | | | 1150 | | | | | 1155 | | | |
| 5 | Lys | Asp | Val | Gly | Leu | Lys | Glu | Met | Val | Phe | Pro | Ser | Ser | Arg | Asn |
| | 1160 | | | | | | 1165 | | | | | 1170 | | | |
| | Leu | Phe | Leu | Thr | Asn | Leu | Asp | Asn | Leu | His | Glu | Asn | Asn | Thr | His |
| | 1175 | | | | | | 1180 | | | | | 1185 | | | |
| 10 | Asn | Gln | Glu | Lys | Lys | Ile | Gln | Glu | Glu | Ile | Glu | Lys | Lys | Glu | Thr |
| | 1190 | | | | | | 1195 | | | | | 1200 | | | |
| | Leu | Ile | Gln | Glu | Asn | Val | Val | Leu | Pro | Gln | Ile | His | Thr | Val | Thr |
| | 1205 | | | | | | 1210 | | | | | 1215 | | | |
| 15 | Gly | Thr | Lys | Asn | Phe | Met | Lys | Asn | Leu | Phe | Leu | Leu | Ser | Thr | Arg |
| | 1220 | | | | | | 1225 | | | | | 1230 | | | |
| | Gln | Asn | Val | Glu | Gly | Ser | Tyr | Asp | Gly | Ala | Tyr | Ala | Pro | Val | Leu |
| | 1235 | | | | | | 1240 | | | | | 1245 | | | |
| 20 | Gln | Asp | Phe | Arg | Ser | Leu | Asn | Asp | Ser | Thr | Asn | Arg | Thr | Lys | Lys |
| | 1250 | | | | | | 1255 | | | | | 1260 | | | |
| | His | Thr | Ala | His | Phe | Ser | Lys | Lys | Gly | Glu | Glu | Glu | Asn | Leu | Glu |
| 25 | 1265 | | | | | | 1270 | | | | | 1275 | | | |
| | Gly | Leu | Gly | Asn | Gln | Thr | Lys | Gln | Ile | Val | Glu | Lys | Tyr | Ala | Cys |
| | 1280 | | | | | | 1285 | | | | | 1290 | | | |
| 30 | Thr | Thr | Arg | Ile | Ser | Pro | Asn | Thr | Ser | Gln | Gln | Asn | Phe | Val | Thr |
| | 1295 | | | | | | 1300 | | | | | 1305 | | | |
| | Gln | Arg | Ser | Lys | Arg | Ala | Leu | Lys | Gln | Phe | Arg | Leu | Pro | Leu | Glu |
| | 1310 | | | | | | 1315 | | | | | 1320 | | | |
| 35 | Glu | Thr | Glu | Leu | Glu | Lys | Arg | Ile | Ile | Val | Asp | Asp | Thr | Ser | Thr |
| | 1325 | | | | | | 1330 | | | | | 1335 | | | |
| | Gln | Trp | Ser | Lys | Asn | Met | Lys | His | Leu | Thr | Pro | Ser | Thr | Leu | Thr |
| 40 | 1340 | | | | | | 1345 | | | | | 1350 | | | |
| | Gln | Ile | Asp | Tyr | Asn | Glu | Lys | Glu | Lys | Gly | Ala | Ile | Thr | Gln | Ser |
| | 1355 | | | | | | 1360 | | | | | 1365 | | | |
| 45 | Pro | Leu | Ser | Asp | Cys | Leu | Thr | Arg | Ser | His | Ser | Ile | Pro | Gln | Ala |
| | 1370 | | | | | | 1375 | | | | | 1380 | | | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | Asn | Arg | Ser | Pro | Leu | Pro | Ile | Ala | Lys | Val | Ser | Ser | Phe | Pro | Ser |
| | 1385 | | | | | | 1390 | | | | | 1395 | | | |
| 5 | Ile | Arg | Pro | Ile | Tyr | Leu | Thr | Arg | Val | Leu | Phe | Gln | Asp | Asn | Ser |
| | 1400 | | | | | | 1405 | | | | | 1410 | | | |
| | Ser | His | Leu | Pro | Ala | Ala | Ser | Tyr | Arg | Lys | Lys | Asp | Ser | Gly | Val |
| | 1415 | | | | | | 1420 | | | | | 1425 | | | |
| 10 | Gln | Glu | Ser | Ser | His | Phe | Leu | Gln | Gly | Ala | Lys | Lys | Asn | Asn | Leu |
| | 1430 | | | | | | 1435 | | | | | 1440 | | | |
| | Ser | Leu | Ala | Ile | Leu | Thr | Leu | Glu | Met | Thr | Gly | Asp | Gln | Arg | Glu |
| 15 | 1445 | | | | | | 1450 | | | | | 1455 | | | |
| | Val | Gly | Ser | Leu | Gly | Thr | Ser | Ala | Thr | Asn | Ser | Val | Thr | Tyr | Lys |
| | 1460 | | | | | | 1465 | | | | | 1470 | | | |
| | Lys | Val | Glu | Asn | Thr | Val | Leu | Pro | Lys | Pro | Asp | Leu | Pro | Lys | Thr |
| 20 | 1475 | | | | | | 1480 | | | | | 1485 | | | |
| | Ser | Gly | Lys | Val | Glu | Leu | Leu | Pro | Lys | Val | His | Ile | Tyr | Gln | Lys |
| | 1490 | | | | | | 1495 | | | | | 1500 | | | |
| 25 | Asp | Leu | Phe | Pro | Thr | Glu | Thr | Ser | Asn | Gly | Ser | Pro | Gly | His | Leu |
| | 1505 | | | | | | 1510 | | | | | 1515 | | | |
| | Asp | Leu | Val | Glu | Gly | Ser | Leu | Leu | Gln | Gly | Thr | Glu | Gly | Ala | Ile |
| 30 | 1520 | | | | | | 1525 | | | | | 1530 | | | |
| | Lys | Trp | Asn | Glu | Ala | Asn | Arg | Pro | Gly | Lys | Val | Pro | Phe | Leu | Arg |
| | 1535 | | | | | | 1540 | | | | | 1545 | | | |
| | Val | Ala | Thr | Glu | Ser | Ser | Ala | Lys | Thr | Pro | Ser | Lys | Leu | Leu | Asp |
| 35 | 1550 | | | | | | 1555 | | | | | 1560 | | | |
| | Pro | Leu | Ala | Trp | Asp | Asn | His | Tyr | Gly | Thr | Gln | Ile | Pro | Lys | Glu |
| | 1565 | | | | | | 1570 | | | | | 1575 | | | |
| 40 | Glu | Trp | Lys | Ser | Gln | Glu | Lys | Ser | Pro | Glu | Lys | Thr | Ala | Phe | Lys |
| | 1580 | | | | | | 1585 | | | | | 1590 | | | |
| | Lys | Lys | Asp | Thr | Ile | Leu | Ser | Leu | Asn | Ala | Cys | Glu | Ser | Asn | His |
| | 1595 | | | | | | 1600 | | | | | 1605 | | | |
| 45 | Ala | Ile | Ala | Ala | Ile | Asn | Glu | Gly | Gln | Asn | Lys | Pro | Glu | Ile | Glu |
| | 1610 | | | | | | 1615 | | | | | 1620 | | | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | Val | Thr | Trp | Ala | Lys | Gln | Gly | Arg | Thr | Glu | Arg | Leu | Cys | Ser | Gln |
| | | 1625 | | | | | 1630 | | | | | 1635 | | | |
| 5 | Asn | Pro | Pro | Val | Leu | Lys | Arg | His | Gln | Arg | Glu | Ile | Thr | Arg | Thr |
| | | 1640 | | | | | 1645 | | | | | 1650 | | | |
| | Thr | Leu | Gln | Ser | Asp | Gln | Glu | Glu | Ile | Asp | Tyr | Asp | Asp | Thr | Ile |
| | | 1655 | | | | | 1660 | | | | | 1665 | | | |
| 10 | Ser | Val | Glu | Met | Lys | Lys | Glu | Asp | Phe | Asp | Ile | Tyr | Asp | Glu | Asp |
| | | 1670 | | | | | 1675 | | | | | 1680 | | | |
| | Glu | Asn | Gln | Ser | Pro | Arg | Ser | Phe | Gln | Lys | Lys | Thr | Arg | His | Tyr |
| | | 1685 | | | | | 1690 | | | | | 1695 | | | |
| 15 | Phe | Ile | Ala | Ala | Val | Glu | Arg | Leu | Trp | Asp | Tyr | Gly | Met | Ser | Ser |
| | | 1700 | | | | | 1705 | | | | | 1710 | | | |
| | Ser | Pro | His | Val | Leu | Arg | Asn | Arg | Ala | Gln | Ser | Gly | Ser | Val | Pro |
| 20 | | 1715 | | | | | 1720 | | | | | 1725 | | | |
| | Gln | Phe | Lys | Lys | Val | Val | Phe | Gln | Glu | Phe | Thr | Asp | Gly | Ser | Phe |
| | | 1730 | | | | | 1735 | | | | | 1740 | | | |
| 25 | Thr | Gln | Pro | Leu | Tyr | Arg | Gly | Glu | Leu | Asn | Glu | His | Leu | Gly | Leu |
| | | 1745 | | | | | 1750 | | | | | 1755 | | | |
| | Leu | Gly | Pro | Tyr | Ile | Arg | Ala | Glu | Val | Glu | Asp | Asn | Ile | Met | Val |
| | | 1760 | | | | | 1765 | | | | | 1770 | | | |
| 30 | Thr | Phe | Arg | Asn | Gln | Ala | Ser | Arg | Pro | Tyr | Ser | Phe | Tyr | Ser | Ser |
| | | 1775 | | | | | 1780 | | | | | 1785 | | | |
| | Leu | Ile | Ser | Tyr | Glu | Glu | Asp | Gln | Arg | Gln | Gly | Ala | Glu | Pro | Arg |
| 35 | | 1790 | | | | | 1795 | | | | | 1800 | | | |
| | Lys | Asn | Phe | Val | Lys | Pro | Asn | Glu | Thr | Lys | Thr | Tyr | Phe | Trp | Lys |
| | | 1805 | | | | | 1810 | | | | | 1815 | | | |
| 40 | Val | Gln | His | His | Met | Ala | Pro | Thr | Lys | Asp | Glu | Phe | Asp | Cys | Lys |
| | | 1820 | | | | | 1825 | | | | | 1830 | | | |
| | Ala | Trp | Ala | Tyr | Phe | Ser | Asp | Val | Asp | Leu | Glu | Lys | Asp | Val | His |
| | | 1835 | | | | | 1840 | | | | | 1845 | | | |
| 45 | Ser | Gly | Leu | Ile | Gly | Pro | Leu | Leu | Val | Cys | His | Thr | Asn | Thr | Leu |
| | | 1850 | | | | | 1855 | | | | | 1860 | | | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | Asn | Pro | Ala | His | Gly | Arg | Gln | Val | Thr | Val | Gln | Glu | Phe | Ala | Leu |
| | | 1865 | | | | | 1870 | | | | | 1875 | | | |
| 5 | Phe | Phe | Thr | Ile | Phe | Asp | Glu | Thr | Lys | Ser | Trp | Tyr | Phe | Thr | Glu |
| | | 1880 | | | | | 1885 | | | | | 1890 | | | |
| | Asn | Met | Glu | Arg | Asn | Cys | Arg | Ala | Pro | Cys | Asn | Ile | Gln | Met | Glu |
| | | 1895 | | | | | 1900 | | | | | 1905 | | | |
| 10 | Asp | Pro | Thr | Phe | Lys | Glu | Asn | Tyr | Arg | Phe | His | Ala | Ile | Asn | Gly |
| | | 1910 | | | | | 1915 | | | | | 1920 | | | |
| | Tyr | Ile | Met | Asp | Thr | Leu | Pro | Gly | Leu | Val | Met | Ala | Gln | Asp | Gln |
| 15 | | 1925 | | | | | 1930 | | | | | 1935 | | | |
| | Arg | Ile | Arg | Trp | Tyr | Leu | Leu | Ser | Met | Gly | Ser | Asn | Glu | Asn | Ile |
| | | 1940 | | | | | 1945 | | | | | 1950 | | | |
| | His | Ser | Ile | His | Phe | Ser | Gly | His | Val | Phe | Thr | Val | Arg | Lys | Lys |
| 20 | | 1955 | | | | | 1960 | | | | | 1965 | | | |
| | Glu | Glu | Tyr | Lys | Met | Ala | Leu | Tyr | Asn | Leu | Tyr | Pro | Gly | Val | Phe |
| | | 1970 | | | | | 1975 | | | | | 1980 | | | |
| 25 | Glu | Thr | Val | Glu | Met | Leu | Pro | Ser | Lys | Ala | Gly | Ile | Trp | Arg | Val |
| | | 1985 | | | | | 1990 | | | | | 1995 | | | |
| | Glu | Cys | Leu | Ile | Gly | Glu | His | Leu | His | Ala | Gly | Met | Ser | Thr | Leu |
| 30 | | 2000 | | | | | 2005 | | | | | 2010 | | | |
| | Phe | Leu | Val | Tyr | Ser | Asn | Lys | Cys | Gln | Thr | Pro | Leu | Gly | Met | Ala |
| | | 2015 | | | | | 2020 | | | | | 2025 | | | |
| | Ser | Gly | His | Ile | Arg | Asp | Phe | Gln | Ile | Thr | Ala | Ser | Gly | Gln | Tyr |
| 35 | | 2030 | | | | | 2035 | | | | | 2040 | | | |
| | Gly | Gln | Trp | Ala | Pro | Lys | Leu | Ala | Arg | Leu | His | Tyr | Ser | Gly | Ser |
| | | 2045 | | | | | 2050 | | | | | 2055 | | | |
| 40 | Ile | Asn | Ala | Trp | Ser | Thr | Lys | Glu | Pro | Phe | Ser | Trp | Ile | Lys | Val |
| | | 2060 | | | | | 2065 | | | | | 2070 | | | |
| | Asp | Leu | Leu | Ala | Pro | Met | Ile | Ile | His | Gly | Ile | Lys | Thr | Gln | Gly |
| 45 | | 2075 | | | | | 2080 | | | | | 2085 | | | |
| | Ala | Arg | Gln | Lys | Phe | Ser | Ser | Leu | Tyr | Ile | Ser | Gln | Phe | Ile | Ile |
| | | 2090 | | | | | 2095 | | | | | 2100 | | | |

ES 2 476 690 T3

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
 2105 2110 2115

5 Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
 2120 2125 2130

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
 2135 2140 2145

10 Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
 2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
 2165 2170 2175

15 Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
 2180 2185 2190

20 Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 2195 2200 2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
 2210 2215 2220

25 Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
 2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
 2240 2245 2250

30 Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
 2255 2260 2265

35 His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
 2285 2290 2295

40 Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
 2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
 2315 2320 2325

45 Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 2
 50 <211> 1445
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 55 <223> Factor VIII humano truncado del dominio B

ES 2 476 690 T3

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ala | Thr | Arg | Arg | Tyr | Tyr | Leu | Gly | Ala | Val | Glu | Leu | Ser | Trp | Asp | Tyr |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 5 | Met | Gln | Ser | Asp | Leu | Gly | Glu | Leu | Pro | Val | Asp | Ala | Arg | Phe | Pro | Pro |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| 10 | Arg | Val | Pro | Lys | Ser | Phe | Pro | Phe | Asn | Thr | Ser | Val | Val | Tyr | Lys | Lys |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | Thr | Leu | Phe | Val | Glu | Phe | Thr | Asp | His | Leu | Phe | Asn | Ile | Ala | Lys | Pro |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| 15 | Arg | Pro | Pro | Trp | Met | Gly | Leu | Leu | Gly | Pro | Thr | Ile | Gln | Ala | Glu | Val |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | Tyr | Asp | Thr | Val | Val | Ile | Thr | Leu | Lys | Asn | Met | Ala | Ser | His | Pro | Val |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 20 | Ser | Leu | His | Ala | Val | Gly | Val | Ser | Tyr | Trp | Lys | Ala | Ser | Glu | Gly | Ala |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| 25 | Glu | Tyr | Asp | Asp | Gln | Thr | Ser | Gln | Arg | Glu | Lys | Glu | Asp | Asp | Lys | Val |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| | Phe | Pro | Gly | Gly | Ser | His | Thr | Tyr | Val | Trp | Gln | Val | Leu | Lys | Glu | Asn |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 30 | Gly | Pro | Met | Ala | Ser | Asp | Pro | Leu | Cys | Leu | Thr | Tyr | Ser | Tyr | Leu | Ser |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | His | Val | Asp | Leu | Val | Lys | Asp | Leu | Asn | Ser | Gly | Leu | Ile | Gly | Ala | Leu |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 35 | Leu | Val | Cys | Arg | Glu | Gly | Ser | Leu | Ala | Lys | Glu | Lys | Thr | Gln | Thr | Leu |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| 40 | His | Lys | Phe | Ile | Leu | Leu | Phe | Ala | Val | Phe | Asp | Glu | Gly | Lys | Ser | Trp |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| | His | Ser | Glu | Thr | Lys | Asn | Ser | Leu | Met | Gln | Asp | Arg | Asp | Ala | Ala | Ser |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ala | Arg | Ala | Trp | Pro | Lys | Met | His | Thr | Val | Asn | Gly | Tyr | Val | Asn | Arg |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 5 | Ser | Leu | Pro | Gly | Leu | Ile | Gly | Cys | His | Arg | Lys | Ser | Val | Tyr | Trp | His |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Val | Ile | Gly | Met | Gly | Thr | Thr | Pro | Glu | Val | His | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 10 | Gly | His | Thr | Phe | Leu | Val | Arg | Asn | His | Arg | Gln | Ala | Ser | Leu | Glu | Ile |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| | Ser | Pro | Ile | Thr | Phe | Leu | Thr | Ala | Gln | Thr | Leu | Leu | Met | Asp | Leu | Gly |
| 15 | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| | Gln | Phe | Leu | Leu | Phe | Cys | His | Ile | Ser | Ser | His | Gln | His | Asp | Gly | Met |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| 20 | Glu | Ala | Tyr | Val | Lys | Val | Asp | Ser | Cys | Pro | Glu | Glu | Pro | Gln | Leu | Arg |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| | Met | Lys | Asn | Asn | Glu | Glu | Ala | Glu | Asp | Tyr | Asp | Asp | Asp | Leu | Thr | Asp |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| 25 | Ser | Glu | Met | Asp | Val | Val | Arg | Phe | Asp | Asp | Asp | Asn | Ser | Pro | Ser | Phe |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| | Ile | Gln | Ile | Arg | Ser | Val | Ala | Lys | Lys | His | Pro | Lys | Thr | Trp | Val | His |
| 30 | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| | Tyr | Ile | Ala | Ala | Glu | Glu | Glu | Asp | Trp | Asp | Tyr | Ala | Pro | Leu | Val | Leu |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| 35 | Ala | Pro | Asp | Asp | Arg | Ser | Tyr | Lys | Ser | Gln | Tyr | Leu | Asn | Asn | Gly | Pro |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| | Gln | Arg | Ile | Gly | Arg | Lys | Tyr | Lys | Lys | Val | Arg | Phe | Met | Ala | Tyr | Thr |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| 40 | Asp | Glu | Thr | Phe | Lys | Thr | Arg | Glu | Ala | Ile | Gln | His | Glu | Ser | Gly | Ile |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| | Leu | Gly | Pro | Leu | Leu | Tyr | Gly | Glu | Val | Gly | Asp | Thr | Leu | Leu | Ile | Ile |
| 45 | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| | Phe | Lys | Asn | Gln | Ala | Ser | Arg | Pro | Tyr | Asn | Ile | Tyr | Pro | His | Gly | Ile |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Thr | Asp | Val | Arg | Pro | Leu | Tyr | Ser | Arg | Arg | Leu | Pro | Lys | Gly | Val | Lys |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| 5 | His | Leu | Lys | Asp | Phe | Pro | Ile | Leu | Pro | Gly | Glu | Ile | Phe | Lys | Tyr | Lys |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | |
| | Trp | Thr | Val | Thr | Val | Glu | Asp | Gly | Pro | Thr | Lys | Ser | Asp | Pro | Arg | Cys |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| 10 | Leu | Thr | Arg | Tyr | Tyr | Ser | Ser | Phe | Val | Asn | Met | Glu | Arg | Asp | Leu | Ala |
| | | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| | Ser | Gly | Leu | Ile | Gly | Pro | Leu | Leu | Ile | Cys | Tyr | Lys | Glu | Ser | Val | Asp |
| 15 | | 545 | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| | Gln | Arg | Gly | Asn | Gln | Ile | Met | Ser | Asp | Lys | Arg | Asn | Val | Ile | Leu | Phe |
| | | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | |
| 20 | Ser | Val | Phe | Asp | Glu | Asn | Arg | Ser | Trp | Tyr | Leu | Thr | Glu | Asn | Ile | Gln |
| | | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| | Arg | Phe | Leu | Pro | Asn | Pro | Ala | Gly | Val | Gln | Leu | Glu | Asp | Pro | Glu | Phe |
| | | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| 25 | Gln | Ala | Ser | Asn | Ile | Met | His | Ser | Ile | Asn | Gly | Tyr | Val | Phe | Asp | Ser |
| | | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | |
| | Leu | Gln | Leu | Ser | Val | Cys | Leu | His | Glu | Val | Ala | Tyr | Trp | Tyr | Ile | Leu |
| 30 | | 625 | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| | Ser | Ile | Gly | Ala | Gln | Thr | Asp | Phe | Leu | Ser | Val | Phe | Phe | Ser | Gly | Tyr |
| | | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| 35 | Thr | Phe | Lys | His | Lys | Met | Val | Tyr | Glu | Asp | Thr | Leu | Thr | Leu | Phe | Pro |
| | | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | |
| | Phe | Ser | Gly | Glu | Thr | Val | Phe | Met | Ser | Met | Glu | Asn | Pro | Gly | Leu | Trp |
| | | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | |
| 40 | Ile | Leu | Gly | Cys | His | Asn | Ser | Asp | Phe | Arg | Asn | Arg | Gly | Met | Thr | Ala |
| | | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | |
| | Leu | Leu | Lys | Val | Ser | Ser | Cys | Asp | Lys | Asn | Thr | Gly | Asp | Tyr | Tyr | Glu |
| 45 | | 705 | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 |
| | Asp | Ser | Tyr | Glu | Asp | Ile | Ser | Ala | Tyr | Leu | Leu | Ser | Lys | Asn | Asn | Ala |
| | | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ile | Glu | Pro | Arg | Ser | Phe | Ser | Gln | Asn | Ser | Arg | His | Pro | Ser | Gln | Asn |
| | | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | |
| 5 | Pro | Pro | Val | Leu | Lys | Arg | His | Gln | Arg | Glu | Ile | Thr | Arg | Thr | Thr | Leu |
| | | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | |
| | Gln | Ser | Asp | Gln | Glu | Glu | Ile | Asp | Tyr | Asp | Asp | Thr | Ile | Ser | Val | Glu |
| | | 770 | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | |
| 10 | Met | Lys | Lys | Glu | Asp | Phe | Asp | Ile | Tyr | Asp | Glu | Asp | Glu | Asn | Gln | Ser |
| | 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 |
| | Pro | Arg | Ser | Phe | Gln | Lys | Lys | Thr | Arg | His | Tyr | Phe | Ile | Ala | Ala | Val |
| 15 | | | | 805 | | | | | | 810 | | | | | 815 | |
| | Glu | Arg | Leu | Trp | Asp | Tyr | Gly | Met | Ser | Ser | Ser | Pro | His | Val | Leu | Arg |
| | | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | |
| | Asn | Arg | Ala | Gln | Ser | Gly | Ser | Val | Pro | Gln | Phe | Lys | Lys | Val | Val | Phe |
| 20 | | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | |
| | Gln | Glu | Phe | Thr | Asp | Gly | Ser | Phe | Thr | Gln | Pro | Leu | Tyr | Arg | Gly | Glu |
| | | 850 | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | |
| 25 | Leu | Asn | Glu | His | Leu | Gly | Leu | Leu | Gly | Pro | Tyr | Ile | Arg | Ala | Glu | Val |
| | 865 | | | | | 870 | | | | | 875 | | | | | 880 |
| | Glu | Asp | Asn | Ile | Met | Val | Thr | Phe | Arg | Asn | Gln | Ala | Ser | Arg | Pro | Tyr |
| 30 | | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | 895 | |
| | Ser | Phe | Tyr | Ser | Ser | Leu | Ile | Ser | Tyr | Glu | Glu | Asp | Gln | Arg | Gln | Gly |
| | | | | 900 | | | | | 905 | | | | | 910 | | |
| | Ala | Glu | Pro | Arg | Lys | Asn | Phe | Val | Lys | Pro | Asn | Glu | Thr | Lys | Thr | Tyr |
| 35 | | | 915 | | | | | 920 | | | | | 925 | | | |
| | Phe | Trp | Lys | Val | Gln | His | His | Met | Ala | Pro | Thr | Lys | Asp | Glu | Phe | Asp |
| | | 930 | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | |
| 40 | Cys | Lys | Ala | Trp | Ala | Tyr | Phe | Ser | Asp | Val | Asp | Leu | Glu | Lys | Asp | Val |
| | 945 | | | | | 950 | | | | | 955 | | | | | 960 |
| | His | Ser | Gly | Leu | Ile | Gly | Pro | Leu | Leu | Val | Cys | His | Thr | Asn | Thr | Leu |
| | | | | 965 | | | | | | 970 | | | | | 975 | |
| 45 | Asn | Pro | Ala | His | Gly | Arg | Gln | Val | Thr | Val | Gln | Glu | Phe | Ala | Leu | Phe |
| | | | | 980 | | | | | 985 | | | | | 990 | | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| | Phe | Thr | Ile | Phe | Asp | Glu | Thr | Lys | Ser | Trp | Tyr | Phe | Thr | Glu | Asn | Met |
| | | | 995 | | | | | 1000 | | | | | 1005 | | | |
| 5 | Glu | Arg | Asn | Cys | Arg | Ala | Pro | Cys | Asn | Ile | Gln | Met | Glu | Asp | Pro | |
| | | 1010 | | | | | 1015 | | | | | 1020 | | | | |
| | Thr | Phe | Lys | Glu | Asn | Tyr | Arg | Phe | His | Ala | Ile | Asn | Gly | Tyr | Ile | |
| | | 1025 | | | | | 1030 | | | | | 1035 | | | | |
| 10 | Met | Asp | Thr | Leu | Pro | Gly | Leu | Val | Met | Ala | Gln | Asp | Gln | Arg | Ile | |
| | | 1040 | | | | | 1045 | | | | | 1050 | | | | |
| | Arg | Trp | Tyr | Leu | Leu | Ser | Met | Gly | Ser | Asn | Glu | Asn | Ile | His | Ser | |
| 15 | | 1055 | | | | | 1060 | | | | | 1065 | | | | |
| | Ile | His | Phe | Ser | Gly | His | Val | Phe | Thr | Val | Arg | Lys | Lys | Glu | Glu | |
| | | 1070 | | | | | 1075 | | | | | 1080 | | | | |
| 20 | Tyr | Lys | Met | Ala | Leu | Tyr | Asn | Leu | Tyr | Pro | Gly | Val | Phe | Glu | Thr | |
| | | 1085 | | | | | 1090 | | | | | 1095 | | | | |
| | Val | Glu | Met | Leu | Pro | Ser | Lys | Ala | Gly | Ile | Trp | Arg | Val | Glu | Cys | |
| | | 1100 | | | | | 1105 | | | | | 1110 | | | | |
| 25 | Leu | Ile | Gly | Glu | His | Leu | His | Ala | Gly | Met | Ser | Thr | Leu | Phe | Leu | |
| | | 1115 | | | | | 1120 | | | | | 1125 | | | | |
| | Val | Tyr | Ser | Asn | Lys | Cys | Gln | Thr | Pro | Leu | Gly | Met | Ala | Ser | Gly | |
| 30 | | 1130 | | | | | 1135 | | | | | 1140 | | | | |
| | His | Ile | Arg | Asp | Phe | Gln | Ile | Thr | Ala | Ser | Gly | Gln | Tyr | Gly | Gln | |
| | | 1145 | | | | | 1150 | | | | | 1155 | | | | |
| 35 | Trp | Ala | Pro | Lys | Leu | Ala | Arg | Leu | His | Tyr | Ser | Gly | Ser | Ile | Asn | |
| | | 1160 | | | | | 1165 | | | | | 1170 | | | | |
| | Ala | Trp | Ser | Thr | Lys | Glu | Pro | Phe | Ser | Trp | Ile | Lys | Val | Asp | Leu | |
| | | 1175 | | | | | 1180 | | | | | 1185 | | | | |
| 40 | Leu | Ala | Pro | Met | Ile | Ile | His | Gly | Ile | Lys | Thr | Gln | Gly | Ala | Arg | |
| | | 1190 | | | | | 1195 | | | | | 1200 | | | | |
| | Gln | Lys | Phe | Ser | Ser | Leu | Tyr | Ile | Ser | Gln | Phe | Ile | Ile | Met | Tyr | |
| 45 | | 1205 | | | | | 1210 | | | | | 1215 | | | | |
| | Ser | Leu | Asp | Gly | Lys | Lys | Trp | Gln | Thr | Tyr | Arg | Gly | Asn | Ser | Thr | |
| | | 1220 | | | | | 1225 | | | | | 1230 | | | | |

ES 2 476 690 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | Gly | Thr | Leu | Met | Val | Phe | Phe | Gly | Asn | Val | Asp | Ser | Ser | Gly | Ile |
| | | 1235 | | | | | 1240 | | | | | 1245 | | | |
| 5 | Lys | His | Asn | Ile | Phe | Asn | Pro | Pro | Ile | Ile | Ala | Arg | Tyr | Ile | Arg |
| | | 1250 | | | | | 1255 | | | | | 1260 | | | |
| | Leu | His | Pro | Thr | His | Tyr | Ser | Ile | Arg | Ser | Thr | Leu | Arg | Met | Glu |
| | | 1265 | | | | | 1270 | | | | | 1275 | | | |
| 10 | Leu | Met | Gly | Cys | Asp | Leu | Asn | Ser | Cys | Ser | Met | Pro | Leu | Gly | Met |
| | | 1280 | | | | | 1285 | | | | | 1290 | | | |
| | Glu | Ser | Lys | Ala | Ile | Ser | Asp | Ala | Gln | Ile | Thr | Ala | Ser | Ser | Tyr |
| | | 1295 | | | | | 1300 | | | | | 1305 | | | |
| 15 | Phe | Thr | Asn | Met | Phe | Ala | Thr | Trp | Ser | Pro | Ser | Lys | Ala | Arg | Leu |
| | | 1310 | | | | | 1315 | | | | | 1320 | | | |
| | His | Leu | Gln | Gly | Arg | Ser | Asn | Ala | Trp | Arg | Pro | Gln | Val | Asn | Asn |
| 20 | | 1325 | | | | | 1330 | | | | | 1335 | | | |
| | Pro | Lys | Glu | Trp | Leu | Gln | Val | Asp | Phe | Gln | Lys | Thr | Met | Lys | Val |
| | | 1340 | | | | | 1345 | | | | | 1350 | | | |
| 25 | Thr | Gly | Val | Thr | Thr | Gln | Gly | Val | Lys | Ser | Leu | Leu | Thr | Ser | Met |
| | | 1355 | | | | | 1360 | | | | | 1365 | | | |
| | Tyr | Val | Lys | Glu | Phe | Leu | Ile | Ser | Ser | Ser | Gln | Asp | Gly | His | Gln |
| | | 1370 | | | | | 1375 | | | | | 1380 | | | |
| 30 | Trp | Thr | Leu | Phe | Phe | Gln | Asn | Gly | Lys | Val | Lys | Val | Phe | Gln | Gly |
| | | 1385 | | | | | 1390 | | | | | 1395 | | | |
| | Asn | Gln | Asp | Ser | Phe | Thr | Pro | Val | Val | Asn | Ser | Leu | Asp | Pro | Pro |
| | | 1400 | | | | | 1405 | | | | | 1410 | | | |
| 35 | Leu | Leu | Thr | Arg | Tyr | Leu | Arg | Ile | His | Pro | Gln | Ser | Trp | Val | His |
| | | 1415 | | | | | 1420 | | | | | 1425 | | | |
| | Gln | Ile | Ala | Leu | Arg | Met | Glu | Val | Leu | Gly | Cys | Glu | Ala | Gln | Asp |
| 40 | | 1430 | | | | | 1435 | | | | | 1440 | | | |
| | Leu | Tyr | | | | | | | | | | | | | |
| | | 1445 | | | | | | | | | | | | | |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula del Factor VIII con dominio B truncado con una vida media circulatoria modificada, siendo conjugada dicha molécula de forma covalente con un polímero hidrofílico por medio de un oligosacárido O-ligado en el dominio B truncado, donde:
- (i) la activación del Factor VIII resulta en la eliminación del polímero hidrofílico conjugado de forma covalente;
(ii) las porciones de la cadena pesada y la ligera del polipéptido precursor de FVIII son separadas por un enlace, donde la secuencia del enlace deriva del dominio B de FVIII; y
10 (iii) el enlace comprende un sitio de reconocimiento para la proteasa que separa el polipéptido precursor de FVIII de dominio B truncado en la cadena pesada y la ligera.
2. Molécula según la reivindicación 1, donde la longitud del dominio B es de 20-30 aminoácidos.
- 15 3. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polímero hidrofílico es PEG.
4. Molécula según la reivindicación 3, donde el tamaño del PEG es desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 160.000 Da.
- 20 5. Molécula según la reivindicación 4, donde el tamaño del PEG es aproximadamente 40.000 Da.
6. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polímero hidrofílico es polisacárido.
7. Molécula según la reivindicación 6, donde el polisacárido es ácido poli siálico.
- 25 8. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende la secuencia de aminoácido como se expone en la SEC ID NO 2.
9. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el dominio B truncado es un aminoácido más corto que en la SEC ID NO 2.
- 30 10. Composición farmacéutica que comprende una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Método para elaborar una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicho método comprende conjugar una molécula del Factor VIII con dominio B truncado con un polímero hidrofílico por medio de un oligosacárido O-ligado en el dominio B truncado.
- 35 12. Molécula obtenible a través del método según la reivindicación 11.
- 40 13. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 12 para uso como un medicamento para el tratamiento de hemofilia.
14. Uso de una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 12 o una composición farmacéutica según la reivindicación 10 para el tratamiento de hemofilia a través de administración subcutánea.
- 45 15. Uso de una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 12 o una composición farmacéutica según la reivindicación 10 para el uso en el tratamiento de hemofilia por administración intravenosa.

FIGURA 1

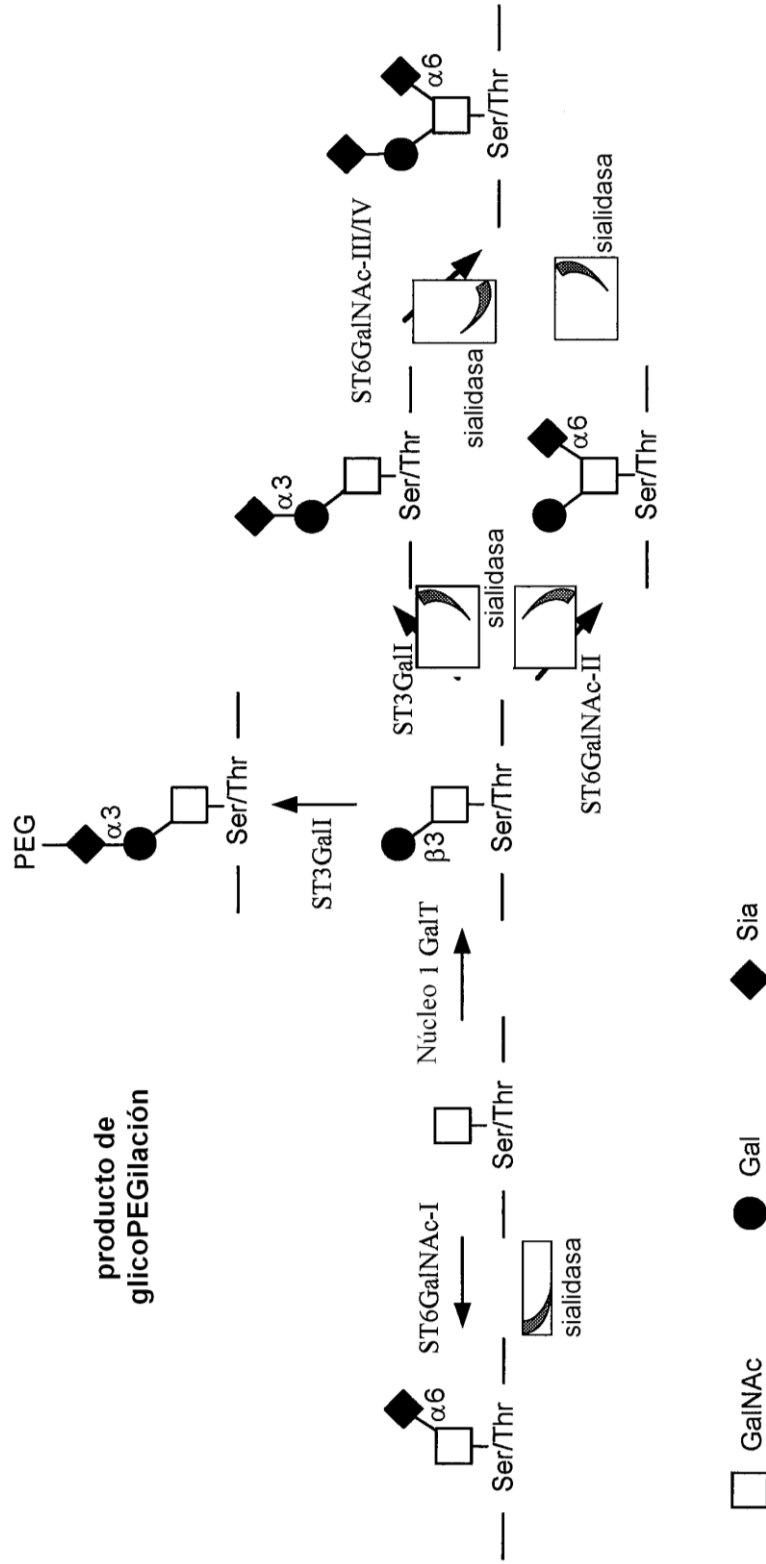
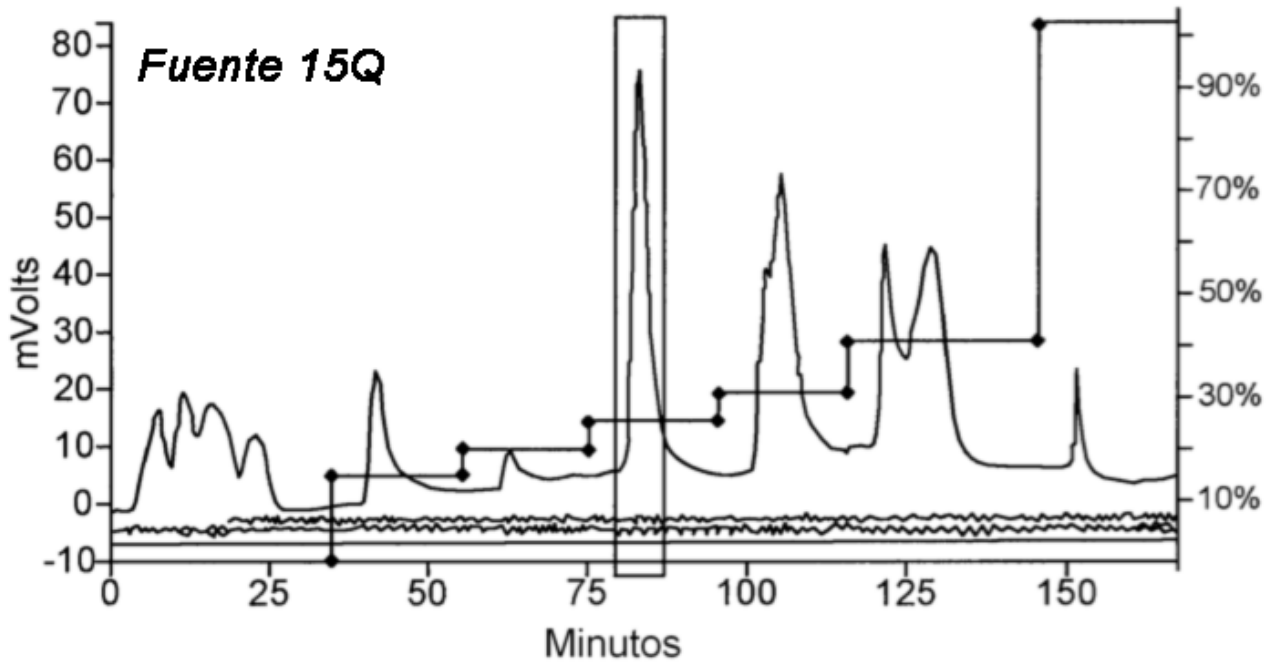


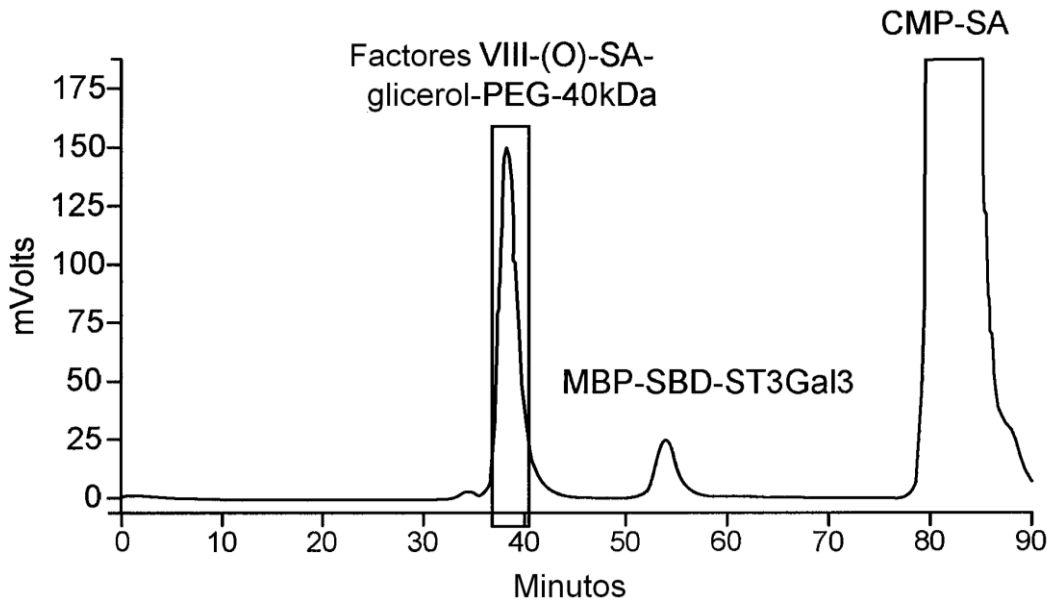
FIGURA 2



Fracción de Producto



FIGURA 3



Línea 1; Factor VIII (Concentrado)
 Línea 2; GlicoPEGilación, 0hrs
 Línea 3; GlicoPEGilación, 30hrs
 Línea 4; GlicoPE Gilación, 43hrs
 Línea 5; GlicoPEGilación, 49hrs
 Línea 6; Producto 15Q de Fuente
 Línea 7; Reacción Tapada (11 hrs)
 Línea 8; Producto Purificado por
 Superdex 200

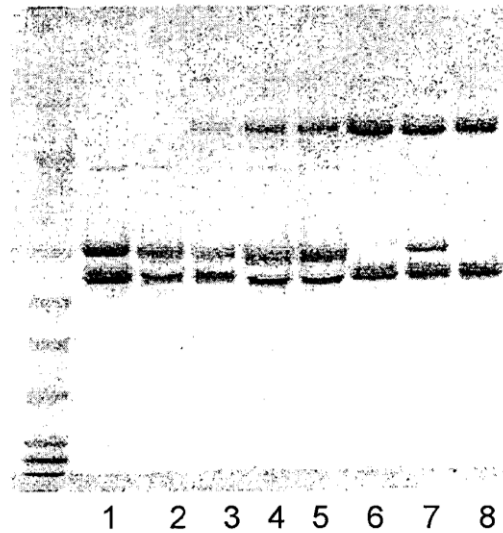


FIGURA 4

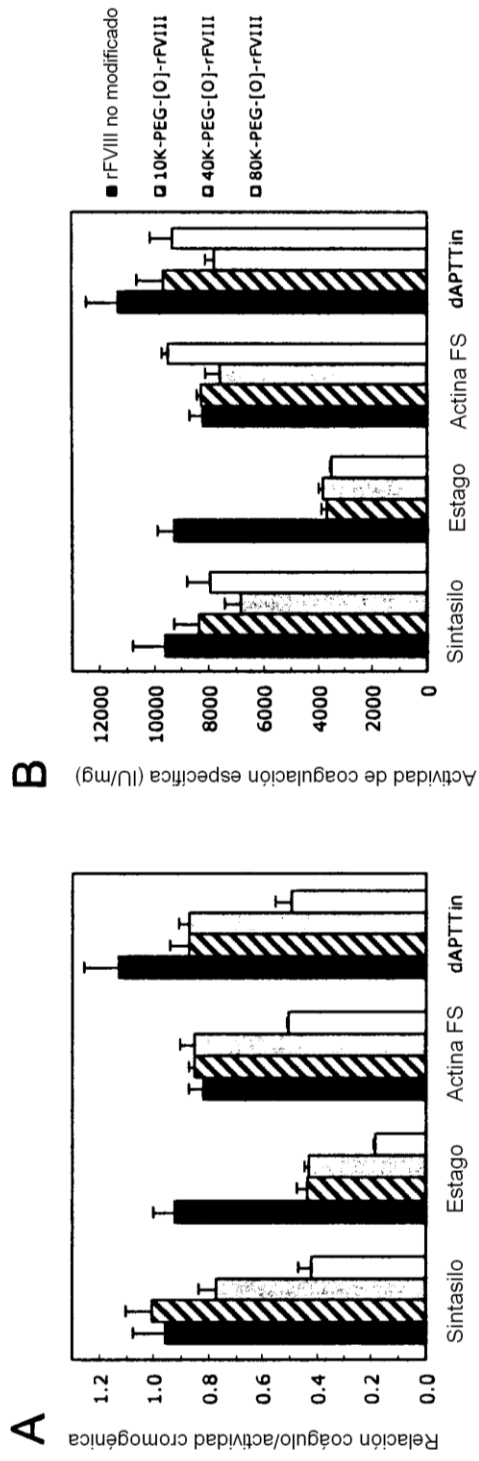


FIGURA 5

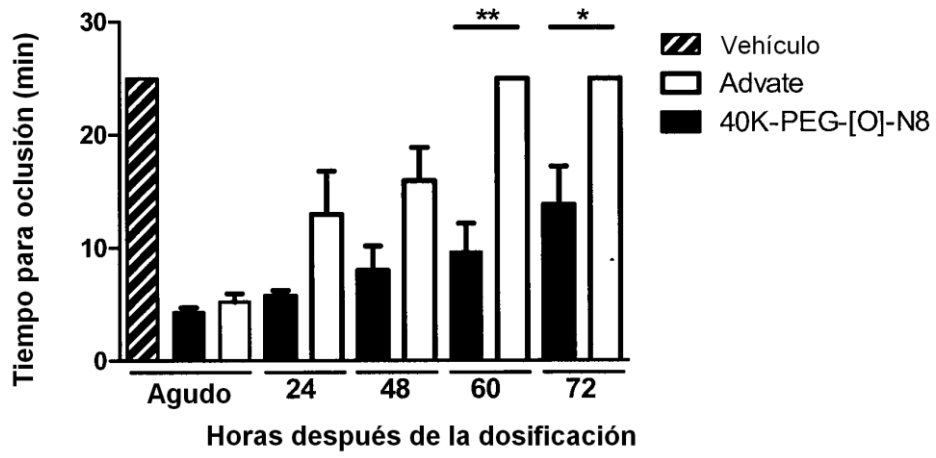


FIGURA 6

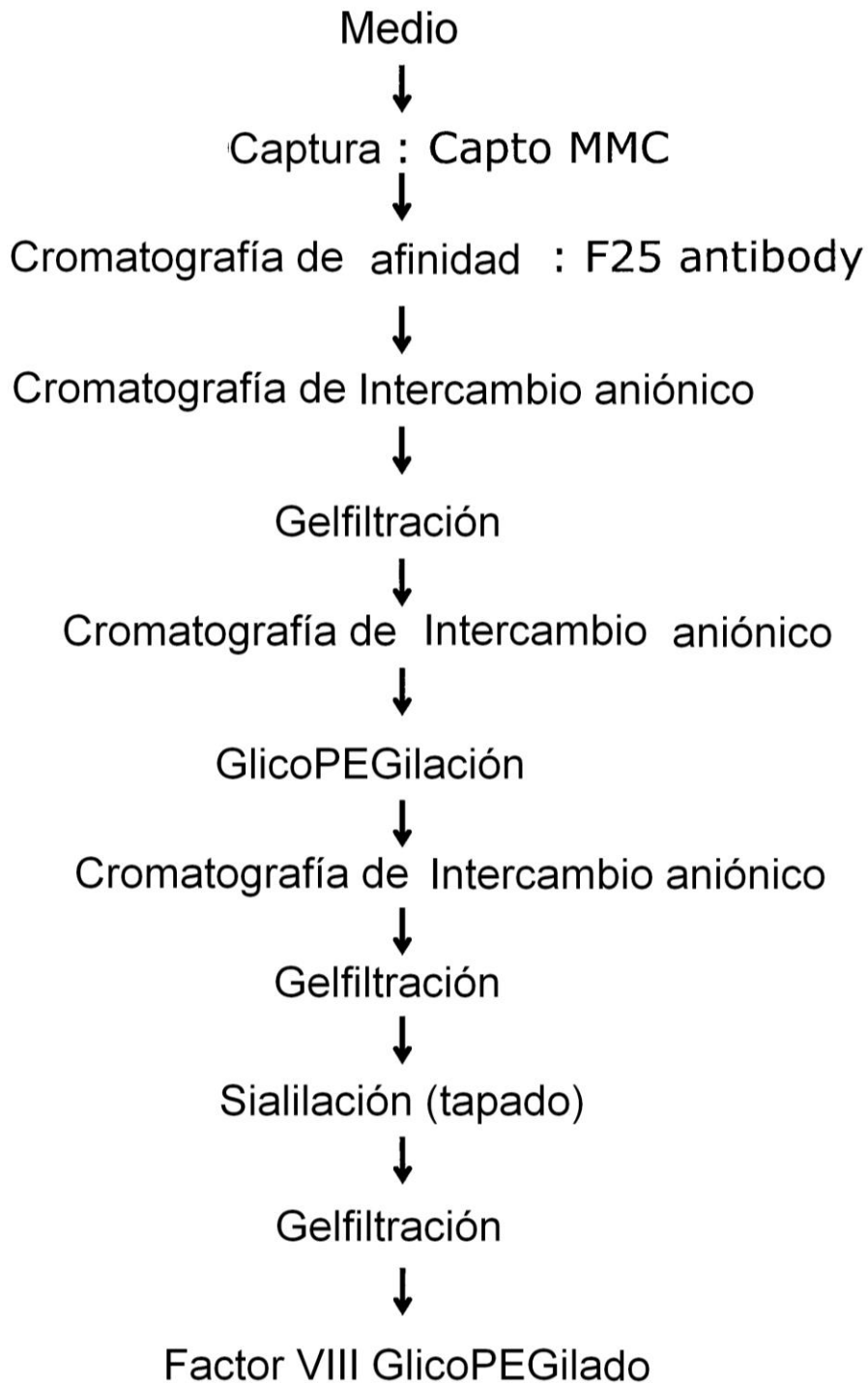


FIGURA 7

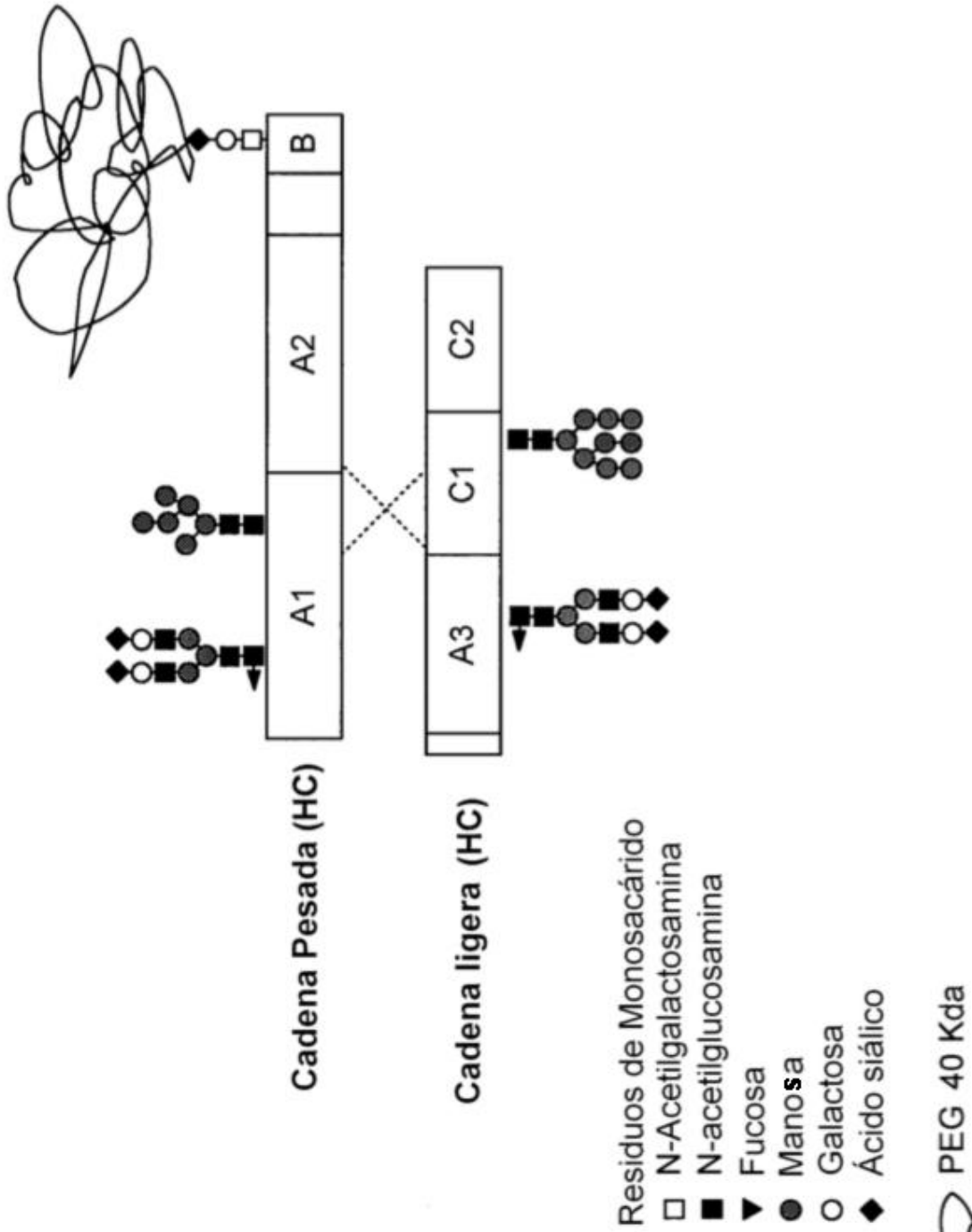
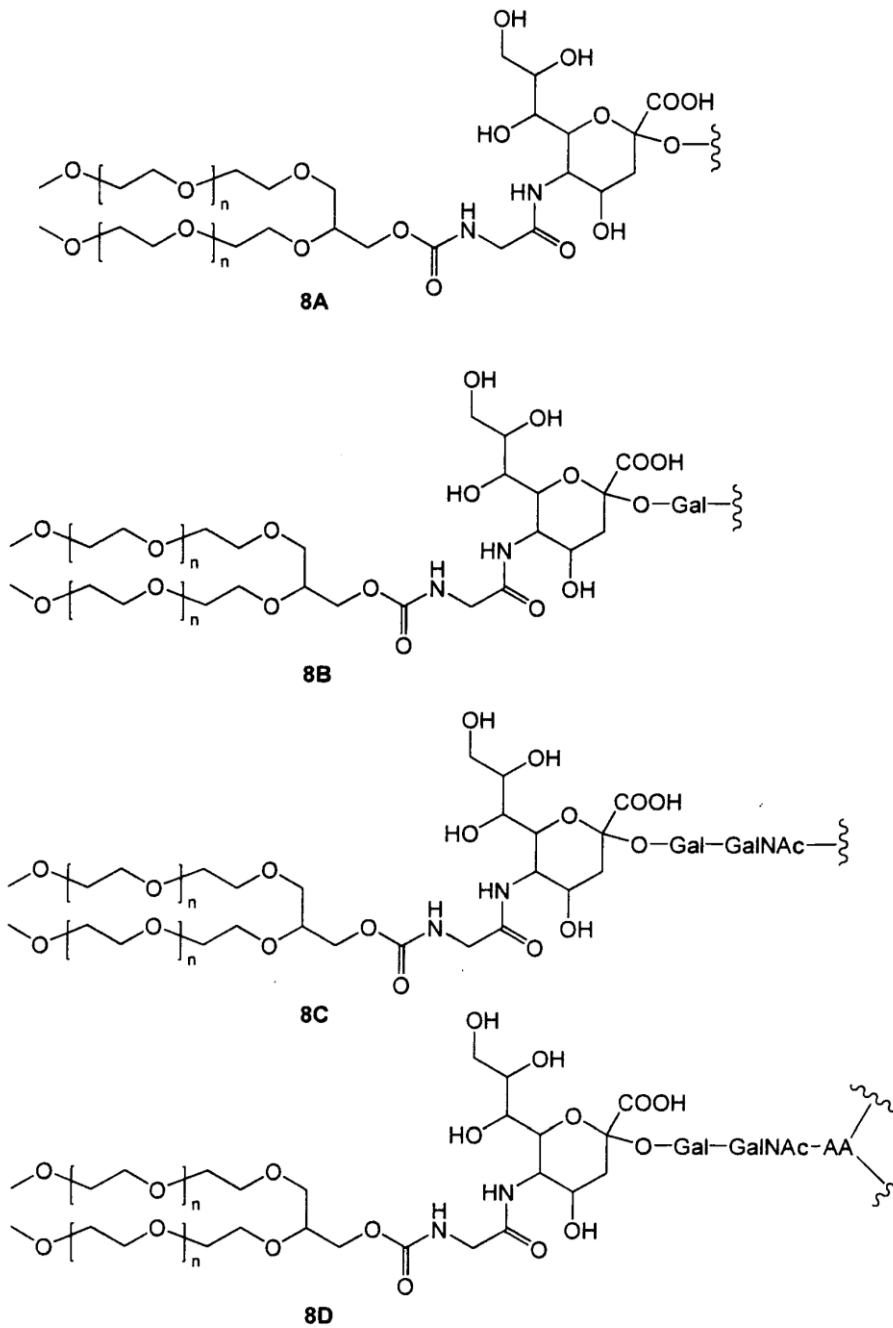


FIGURA 8



$n > 400$ (por ej. ~ 455); $n > 900$ (por ej. ~ 910)