(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 575 629**

(51) Int. CI.:

C07K 14/755 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2003 E 10171071 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2253645**

(54) Título: **Polipéptido del Factor VIII**

(30) Prioridad:

28.01.2003 US 353753

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2016

(73) Titular/es:

SK CHEMICALS CO., LTD. (100.0%)
600, Jeongja-dong Jangan-gu
Suwon-si, KR

(72) Inventor/es:

KIM, HUN-TAEK;
SONG, IN-YOUNG;
CHOI, JAE WON;
JANG, JIN-WOOK;
KIM, YONG-KOOK;
LEE, HO SOON;
BANG, YUNG-JUE y
KIM, DAE-KEE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Polipéptido del Factor VIII

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a polipéptidos del Factor VIII que son más estables que el Factor VIII de longitud completa. La presente invención se refiere también a un método para administrar el polipéptido del Factor VIII a un sujeto para tratar un trastorno de la sangre. La invención se refiere además a una estructura artificial de ácido nucleico que incluye ADN que codifica el polipéptido del Factor VIII. La invención se refiere a un método de expresión del Factor VIII en un mamífero mediante la administración de la estructura artificial génica al sujeto. La invención se refiere además a anticuerpos específicos para el polipéptido del Factor VIII.

Antecedentes generales y estado de la técnica:

La hemofilia A es el resultado de la carencia cuantitativa o cualitativa de Factor VIII (FVIII), que requiere una sustitución exógena con preparaciones de derivados de FVIII plasmáticos o recombinantes. FVIII tiene una organización en dominios A1-A2-B-A3-C1-C2 y se sintetiza como una glicoproteína de cadena sencilla de 2351 aminoácidos de 280 kDa (Eaton, D. et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Toole, J. J. et al., 1984, Nature 312: 342; Vehar, G. A. et al., 1984, Nature 312: 337). Aunque los dominios A y C muestran una identidad de aminoácidos del 35-40% entre sí y con los dominios A y C del factor de coagulación V, el dominio B no es homólogo a ninguna proteína conocida. Un procesamiento intracelular, proteolítico después del residuo Arg-1648 dentro del dominio B genera una cadena ligera de 80 kDa (dominios A3-C1-C2) y una cadena pesada de tamaño heterogéneo de 90-200 kDa (dominios A1-A2-B). Las cadenas pesada y ligera se asocian como un heterodímero a través de un enlace dependiente de iones metálicos divalentes entre los dominios A1 y A3. En el plasma, FVIII circula como una forma inactiva unida al factor de von Willebrand (vWF) y para su activación requiere una escisión proteolítica mediante trombina o Factor Xa (Eaton, D., et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Girma, J. P. et al., 1987, Blood 70: 605-611; Koedam, J. A. et al., 1990, Eur. J. Biochem. 189: 229-234). La escisión con trombina después de los residuos de Arg (R) 372, 740 y 1689, activa la actividad coagulante de FVIII, lo que produce la eliminación completa del dominio B. El heterotrímero FVIIIa resultante conserva el enlace dependiente de iones metálicos entre las subunidades A1 y A3-C1-C2, mientras que A2 se asocia con afinidad débil mediante interacciones electrostáticas (Eaton, D. et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Fay, P. J. et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 8957-8962; Pittman, D. & Kaufman, R. J. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2429-2433).

Gracias a una mejor comprensión de la biosíntesis, la estructura y la función de FVIII, unos estudios han intentado producir moléculas de FVIII mejoradas para la terapia de reemplazo en pacientes con hemofilia A. Estrategias investigadas hasta la actualidad incluyen la deleción o la modificación de secuencias de FVIII, lo que ha dado como resultado una expresión más eficaz. Estudios previos sobre los requisitos para una actividad funcional de FVIII, demostraron que la escisión después de los residuos de Arg 372 y 1689 era necesaria en ambos sitios para una activación de FVIII y que el dominio B no era necesario para la actividad funcional (Eaton, D. L. et al., 1986, Biochemistry 25: 8343; Burke, R. L. et al., 1986, J. Biol. Chem 261: 12574; Toole, J. J. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5939). Con el fin de comprobar esta hipótesis, se realizaron varias metodologías tales como la deleción en el ADN complementario (ADNc), de grandes fragmentos de ADN correspondientes al dominio B, proporcionando derivados de FVIII más cortos (Eaton, D. L. et al., 1986, Biochemistry 25: 8343; Burke, R. L. et al., 1986, J. Biol. Chem 261: 12574) y se sometieron a ensayo para determinar su actividad coagulante.

El documento de solicitud PCT WO 86/06101 describe que las proteínas FVIII recombinantes con deleciones de hasta 880 aminoácidos en la región central todavía muestran actividad de FVIII. Además, Eaton et al., 1986, Biochemistry 25:8343-8347, describen que un polipéptido en el que se han eliminado 766 aminoácidos (desde 797 hasta 1562) de la región del dominio B central, también conserva la actividad de FVIII. Estos derivados de FVIII con deleción del dominio B conservan un sitio de procesamiento proteolítico intracelular dentro del dominio B después del residuo Arg-1648, que se traduce en la generación de derivados heterogéneos de FVIII que comprenden una cadena sencilla o un complejo de dos productos de escisión proteolítica de FVIII, un polipéptido de 90 kDa (dominios A1-A2) y uno de 80 kDa (dominios A3-C1-C2). Además, células de mamífero transformadas con un vector que contenía ADN que codificaba este polipéptido con deleción, tenían un nivel de producción más alto que las células transformadas con un vector que contenía ADN que codificaba el polipéptido de longitud completa. Sin embargo, estos derivados de FVIII con el dominio B delecionado muestran tasas de activación mediante trombina más rápidas y superiores que FVIII de longitud completa, por mecanismos desconocidos (Eaton et al., 1986, Biochemistry 25:8343-8347; Fay et al., 1986, Biochem. Biophys. Acta 871:268-278).

El documento de Patente de EE.UU. nº 5.112.950 describe un derivado de FVIII en el que un derivado de FVIII humano que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos desde alanina-1 hasta aspartato-770 está unido a treonina-1667 a través de tirosina-2332, en donde aspartato-770 está unido covalentemente a través de un enlace peptídico a treonina-1667. Una variedad de estudios indican que los residuos de tirosina en las posiciones 346, 718, 719, 723, 1664 y 1680 son necesarios para la activación completa y la actividad procoagulante del FVIII (Donath M.J. et al., 1995, Biochem. J. 312: 49-55; Michnick D.A. et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:20095-200102). El FVIII que circula en el plasma se combina con vWF, que parece que lo estabiliza; en efecto, la semivida de FVIII *in*

vivo disminuye muy rápidamente en ausencia de vWF (Brinkhous, K. M. et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8752-8756). Estos estudios sugieren firmemente que análogos del Factor VIII con el dominio B delecionado (descritos en el documento de Patente de EE.UU. nº 5.112.950, en particular), con alteraciones estructurales aproximadamente en 1664-1680 en la región A3, pueden tener desventajas potenciales en cuanto a una activación total y una estabilidad *in vivo* debido a una interferencia con la interacción de vWF. Tal y como se describe en el documento de Patente de EE.UU. nº 5.610.278, la coexpresión de las cadenas pesada y ligera en células de mamífero da como resultado una producción detectable de FVIII. Sin embargo, la combinación de las dos cadenas es ineficaz, disminuyendo de ese modo la actividad de la molécula (Burke, R. L. et al., 1986, J. Biol. Chem. 261, 12574; Pavirani A. et al., 1987, Biochem Biophys Res Commun. 145:234). La estrategia de la coexpresión de cadenas pesadas y ligeras como una metodología de terapia génica en animales o seres humanos no es adecuada (Burton M et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:12725).

Los documentos de Patentes de EE.UU. nº 5.422.260 y 5.451.521 se refieren a variantes de FVIII, en donde se modifica uno o varios de los sitios de escisión del Factor Xa, APC y trombina para que dichos sitios sean menos lábiles frente a una proteolisis específica, por ejemplo, en donde uno o ambos de los aminoácidos que definen el sitio de escisión, preferiblemente al menos los residuos de arginina en R-740 o R-1648, se sustituyen por un aminoácido diferente; y en donde se describe la proteína con deleción de aminoácidos desde S-741 hasta R-1648 (fusionando R-740 del sitio de 90 kDa con E-1649 del sitio de 80 kDa), pero no se revela su actividad coagulante. El inconveniente potencial de esta modificación en los sitios de escisión con un aminoácido diferente es que la proteína resultante tendría un nuevo epítopo para provocar potencialmente una respuesta inmunológica. Además, las referencias no proporcionan variantes especificadas con una deleción interna de aminoácidos entre R-740 y R-1689, excepto para la que tiene una deleción interna de aminoácidos desde S-741 hasta R-1648.

Estudios recientes (Chiang GG et al., 1999, Human Gene Therapy 10:61-76) muestran que el FVIII con el dominio B delecionado que se genera mediante la deleción de aminoácidos desde S-743 hasta R-1648 (fusionando F-742 del extremo N-terminal del dominio B con E-1649 del sitio de 80 kDa) que es similar al descrito en los documentos de Patentes de EE.UU. nº 5.422.260 y 5.451.521, mostraba solo ~50% de actividad biológica y menos actividad específica y, por lo tanto, se consideró menos adecuado para una aplicación terapéutica. La razón por la que un FVIII con el dominio B delecionado de este tipo posee menos actividad biológica y específica sigue siendo desconocida. Sin embargo, se supone que la naturaleza de FVIII de cadena sencilla con una deleción de aminoácidos desde S-743 hasta R-1648 puede tener una configuración estructural terciaria diferente, probablemente debido a la ausencia de requisitos espaciales entre la cadena pesada (A1-A2) y la cadena ligera (A3-C1-C2) o a una longitud o una composición no deseadas entre la cadena pesada (A1-A2) y la cadena ligera (A3-C1-C2).

Resumiendo, estas estrategias anteriores, a pesar de que ofrecen un potencial para la preparación más eficaz de una proteína recombinante, no han tenido éxito. Esta falta de éxito se debe posiblemente a sus características moleculares, tales como una población heterogénea de moléculas de FVIII, inestabilidad estructural y diferentes perfiles de activación con trombina, en comparación con FVIII de longitud completa. Además, aunque una variedad de FVIII con el dominio B delecionado se expresa como moléculas fusionadas, existe una posibilidad de que la secuencia de aminoácidos no natural (región de unión de la cadena pesada y la cadena ligera) permanezca sin un procesamiento completo, y cuando se administra en la sangre, muestra posiblemente una nueva antigenicidad (Esmon P.C., et al., 1990, Blood 76: 1593-1600, 1990). Sin embargo, no está claro si las secuencias de aminoácidos no naturales en los sitios de fusión podrían ser inmunogénicas, tal como se ha demostrado en el estudio anterior (Pittman D.D. et al., 1993, Blood 81:2925). Bajo estas circunstancias, se desea el desarrollo de un derivado activo y seguro de FVIII que posea perfiles similares de activación con trombina y una productividad mejorada.

Compendio de la invención

Los presentes inventores han estudiado intensamente la relación funcional estructural de los derivados de FVIII con el fin de desarrollar formas estables y expresadas de manera eficaz de FVIII humano que contiene componentes esenciales, incluyendo una cadena pesada, un enlazador de tipo espaciador polipeptídico y una cadena ligera. Como resultado, en un aspecto, hemos encontrado derivados de FVIII en los que se deleciona una parte principal del dominio B, y la cadena pesada (A1-A2) y la cadena ligera (A3-C1-C2) están unidas por un espaciador polipeptídico de composición y longitud óptimas (hasta aproximadamente 60 aminoácidos, originado a partir de las regiones N-terminales de los dominios B y A3 de la forma natural del Factor VIII humano). Los derivados de FVIII de esta invención se expresan generalmente en una cadena sencilla de FVIII con el dominio B delecionado mediante la fusión de la secuencia N-terminal del dominio B con la secuencia de aminoácidos en A3, más allá de Arg-1648. Algunos de estos derivados de FVIII tienen actividad coagulante completa, actividad específica superior y perfiles de activación con trombina similares, en comparación con FVIII de longitud completa en las mismas circunstancias. Además, para evitar la exposición de un nuevo epítopo de una secuencia de aminoácidos no natural en la región de unión de la cadena pesada y la cadena ligera, hemos creado una secuencia de reconocimiento de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido) en los sitios de fusión. Esto se logró mediante la unión de Asn en las posiciones 745, 757 y 764 a aminoácidos en las posiciones 1650, 1653 y 1656 situados próximos a los aminoácidos Ser o Thr en las posiciones 1651, 1654 y 1657, que generan un sitio de glicosilación ligado a N en los sitios de fusión. Además, esta invención proporciona derivados de FVIII con el dominio B delecionado que contienen modificaciones en la prolina 739 en relación con FVIII natural, que reduce la labilidad de las moléculas para una escisión específica catalizada con proteasas en el sitio de escisión 740. Sin embargo, los derivados de FVIII de esta inven-

ción todavía se pueden activar mediante trombina y todavía poseen actividad procoagulante.

La presente invención se dirige a un polipéptido del Factor VIII que comprende una deleción interna de uno o varios aminoácidos entre 1649 y 1688 fusionado con cualquier secuencia de aminoácidos en el dominio B desde aproximadamente 741 a 782, en relación con una secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1). El polipéptido del Factor VIII puede contener una deleción interna en los aminoácidos 746 a 1649, 746 a 1652, 746 a 1655, 758 a 1649, 758 a 1652, 758 a 1655, 765 a 1649, 765 a 1652, 765 a 1655, 748 a 1658, 755 a 1658, 762 a 1658, 769 a 1658, 776 a 1658 o 783 a 1658. El polipéptido del Factor VIII puede ser una cadena sencilla. Además, en otra realización, la prolina en la posición 739 se puede sustituir por otro aminoácido.

En otro aspecto de la invención, en el polipéptido del Factor VIII de la invención se puede haber introducido una secuencia tripeptídica (Asn-X-Thr o Asn-X-Ser) que incluye los sitios de fusión entre el aminoácido Asn en las posiciones 745, 757 o 764, y el aminoácido Thr o Ser en las posiciones 1651, 1654 o 1657, en relación con la secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

La presente invención también se dirige a un polipéptido del Factor VIII representado por la fórmula siguiente con los siguientes dominios enlazados:

H-S-L

en donde

el dominio H representa una secuencia polipeptídica que comprende sustancialmente Ala-1 hasta Arg-740 del Factor VIII humano de acuerdo con SEQ ID NO: 1;

el dominio S representa un enlazador de tipo espaciador polipeptídico que comprende hasta aproximadamente 60 aminoácidos, en donde el extremo N-terminal del dominio S es aproximadamente el residuo 740, y el extremo C-terminal del dominio S termina aproximadamente en el residuo 1688 del Factor VIII humano de acuerdo con SEQ ID NO: 1; y

el dominio L representa una secuencia polipeptídica que comprende sustancialmente Arg-1689 hasta Tyr-2332 del Factor VIII humano de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

La invención también se dirige a un polipéptido del Factor VIII de acuerdo con lo anterior, en el que el dominio S comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a una secuencia consecutiva desde aproximadamente Ser-741 hasta Asn-745, Arg-747, Lys-754, Asn-757, Ile-761, Asn-764, Lys-768, His-775 o Ile-782. En otra realización, en el polipéptido del Factor VIII anterior, el dominio S comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a una secuencia consecutiva desde aproximadamente Glu-1649 hasta Pro-1688. En otro aspecto de la invención, el dominio de S puede comprender una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a una secuencia consecutiva desde aproximadamente Ile-1650, Thr-1653, Gln-1656 o Gln-1659, hasta Pro-1688. En otro aspecto de la invención, en el dominio S, los aminoácidos 746 a 1649, 746 a 1652, 746 a 1655, 758 a 1649, 758 a 1652, 758 a 1655, 765 a 1649, 765 a 1652, 765 a 1655, 748 a 1658, 755 a 1658, 762 a 1658, 769 a 1658, 776 a 1658 o 783 a 1658 se pueden delecionar, en donde los números de los residuos hacen referencia a SEQ ID NO: 1.

La invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente y a un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo. La invención también se dirige a una composición liofilizada que comprende el polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente.

La invención también se dirige a un método de coagulación de la sangre en un sujeto, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz para la coagulación del polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente. La invención se dirige además a un método para el tratamiento de la hemofilia A en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz para la coagulación del polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente, a una persona que lo requiera.

La invención se dirige a un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente. Además, la invención se dirige a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica el polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente, ligado funcionalmente a un promotor. Y adicionalmente, la invención se dirige a una célula hospedadora que comprende el vector de expresión. En relación con ésto, la invención se dirige a un método para preparar el polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente, que comprende cultivar la célula en condiciones adecuadas para que el vector exprese el polipéptido, y aislar el polipéptido.

La invención se dirige a un método de coagulación sanguínea en un sujeto que comprende:

a) generar un vector vírico o plasmídico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente;

b) transfectar *in vitro* una población de células cultivadas con dicho vector recombinante, lo que da como resultado una población de células transfectadas; y

c) administrar las células a un hospedador mamífero, de modo que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico dentro de dicho hospedador produzca la coagulación de la sangre.

La invención también se dirige a un anticuerpo purificado, específico del polipéptido del Factor VIII descrito anteriormente.

Este y otros objetos de la invención se comprenderán mejor gracias a la siguiente descripción de la invención, los dibujos de referencia que acompañan a la misma y las reivindicaciones adjuntas a la misma.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá más a fondo con la descripción detallada proporcionada en el presente documento a continuación y los dibujos anexos que se ofrecen solamente a modo de ilustración y, por lo tanto, no son limitativos de la presente invención, y en los que;

Las Figuras 1A y 1B muestran la secuencia de aminoácidos de FVIII de longitud completa.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de FVIII de longitud completa y varios derivados de FVIII con el dominio B delecionado, dB747 y dBN(45-50).

La Figura 3 muestra un esquema de la estructura artificial de ADNc para FVIII de longitud completa.

La Figura 4 muestra un esquema de la estructura artificial de ADN para derivados de FVIII en un vector de mamífero.

Las Figuras 5A-5C muestran la síntesis, la secreción y la escisión con trombina de derivados de FVIII expresados en células HEK293.

Figura 5A - células HEK293 transfectadas de forma estable se marcaron con impulsos radiactivos de [^{35}S]metionina durante 30 min. Células duplicadas marcadas se rastrearon durante 6 h en medio que contenía un exceso de metionina sin marcar, y a continuación, se recogieron los extractos celulares (C) y el medio condicionado (M). Volúmenes iguales de extracto celular y de medio condicionado se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-FVIII específico y se analizaron partes alícuotas iguales mediante SDS/PAGE. Todos los derivados se recuperaron a partir de extractos celulares (pistas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y del medio condicionado para el rastreo (pistas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) como especies de cadena sencilla. HEK293 indica células HEK293 que no poseían ADN plasmídico de ADN exógeno.

Figura 5B - líneas celulares HEK293 que expresaban derivados de FVIII se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos. Cuando una monocapa había crecido hasta tener aproximadamente 70-80% de confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM de nuevo aporte. Las células se incubaron durante aproximadamente 24 h y el material sobrenadante del cultivo se recogió, se concentró aproximadamente 100 veces usando Centricon 50.000 MWCO, y se almacenó a -80ºC. La concentración de FVIII se midió usando un método ELISA. A continuación, se separó el material concentrado mediante SDS-PAGE y se analizó mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal (ESH-8). El anticuerpo ESH-8 utilizado en la transferencia Western detectaba una proteína principal, que migraba hasta aproximadamente 170 kDa (indicada por una flecha).

Figura 5C - derivados de FVIII marcados con ^{35}S-metionina se inmunoprecipitaron desde el medio condicionado de rastreo de células HEK293 que se expresaban de forma estable, y se dividieron en partes alícuotas iguales y se incubaron en ausencia (pistas 1, 3, 5 y 7) o presencia (pistas 2, 4, 6 y 8) de trombina (1 U/ml) durante 30 min a 37ºC. Las reacciones se terminaron con tampón de la muestra de SDS-PAGE y los fragmentos de proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 10%. Las formas proteicas de FVIII se indican a la derecha de la siguiente manera: SC, cadena sencilla; A1 y A2, fragmentos de cadena pesada escindidos con trombina; LC, cadena ligera escindida con trombina. Un análisis de la proteína radiomarcada después de la digestión con trombina, indicaba una apariencia normal de los fragmentos de 73 kDa, y los fragmentos de 50 y 40 kDa que se correspondían a los tamaños moleculares de la cadena ligera escindida con trombina, los dominios A1 y A2, respectivamente. Los nombres de cada uno de los derivados de FVIII se indican en la parte superior. Los marcadores de la masa molecular se muestran a la izquierda de cada imagen.

La Figura 6 muestra un esquema de la estructura artificial de ADN para el polipéptido de FVIII en un vector de mamífero.

Las Figuras 7A y 7B muestran una comparación de la cinética de activación con trombina de polipéptidos de FVIII humano recombinante y FVIII. La Figura 7A muestra la cinética de activación con trombina de FVIII recombinante humano (rh FVIII), dB761, dB782, dB761-739F y 739F-dB782. La Figura 7B muestra la cinética de activación con trombina de FVIII recombinante humano (rh FVIII), dBN(57-50), dBN(45-53), dBN(57-56), dBN(64-50), dBN(64-53) y dBN(64-56).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En la presente solicitud, "un" y "una" se utilizan para referirse tanto a un objeto individual como a una pluralidad de objetos. Tal como se usa en esta memoria, "aproximadamente" o "sustancialmente" proporciona en general un margen en la limitación a un número exacto. Por ejemplo, tal como se utiliza en el contexto de la longitud o la posición de una secuencia polipeptídica, "aproximadamente" o "sustancialmente" indica que el polipéptido no está limitado al número exacto mencionado o a la posición que se indica, siempre y cuando la función y el resultado obtenidos sean los mismos. Se pueden insertar, eliminar o añadir o delecionar unas pocas posiciones de aminoácidos, desde los extremos N-terminal o C-terminal siempre y cuando la actividad funcional atribuida a tales posiciones de aminoácidos, tal como la escisión con trombina y funciones de escisión con proteasa, se conserven o se inactiven a través de la deleción o mutación de diversos aminoácidos que pertenecen al sitio de la función. Además, tal como se utiliza en la presente memoria, una secuencia "sustancialmente similar" de ácido nucleico o de aminoácidos se refiere a una secuencia que tiene 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de homología con la secuencia de referencia indicada.

Tal y como se usa en este documento, "aminoácido" y "aminoácidos" se refieren a todos los L-α-aminoácidos de origen natural. Esta definición incluye norleucina, ornitina y homocisteína.

Tal y como se emplea en este documento, en general, la expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos, en comparación con un polipéptido de referencia (por ejemplo, la secuencia natural del Factor VIII). Las alteraciones de los aminoácidos pueden ser sustituciones, inserciones, deleciones o cualquier combinación deseada de tales cambios en una secuencia de aminoácidos natural.

Las variantes por sustitución son aquellas en las que se elimina al menos un residuo de aminoácido en una secuencia natural y un aminoácido diferente se inserta en su lugar en la misma posición. Las sustituciones pueden ser sencillas, en donde solo se sustituye un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en donde se sustituyen dos o más aminoácidos en la misma molécula. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar a partir de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen dentro del alcance de la invención las proteínas o fragmentos o derivados de las mismas que muestran la misma actividad biológica o una similar y los derivados que se modifican de forma diferente durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glicosilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, y así sucesivamente.

Las variantes por inserción son aquellas con uno o varios aminoácidos insertados muy próximamente a un aminoácido en una posición particular en una secuencia de aminoácidos natural. Muy próximamente a un aminoácido significa conectado al grupo α-carboxi o α-amino funcional del aminoácido.

Las variantes por deleción son aquellas en las que se ha eliminado uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos natural. Normalmente, las variantes por deleción tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

En un aspecto, la variante polipeptídica de la presente invención puede contener cualquier cantidad de aminoácidos o alteraciones de aminoácidos en la región no decisiva de FVIII, incluyendo sustituciones y/o inserciones y/o deleciones en cualquier otra región de la molécula polipeptídica, siempre que la variante polipeptídica incluya una secuencia que tenga al menos aproximadamente una identidad del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con aproximadamente 1-740 y/o 1689-2332 de la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1, y la presencia de las variaciones no obstaculicen la actividad de la variante de FVIII.

Los símbolos de los aminoácidos utilizados en la presente solicitud incluyen los siguientes:

> Abreviaturas de una letra o tres letras para los aminoácidos se utilizan en toda la solicitud, y se pueden utilizar de manera intercambiable, y tienen el siguiente significado: A o Ala = alanina; R o Arg = arginina; N o Asn = asparagina; D o Asp = ácido aspártico; C o Cys = cisteína; Q o Gln = glutamina; E o Glu = ácido glutámico; G o Gly = glicina; H o His = histidina; I o Ile = isoleucina; L o Leu = leucina; K o Lys = lisina, M o Met = metionina; F o Phe = fenilalanina; P o Pro = prolina; S o Ser = serina; T o Thr = treonina; W o Trp = triptófano; Y o Tyr = tirosina; y V o Val = valina.

Tal y como se usa en este documento, "derivado del Factor VIII", "variante del Factor VIII" o "polipéptido del Factor VIII" se refiere a un polipéptido que tiene actividad coagulante, actividad específica superior y perfil de activación con trombina similar, en comparación con el Factor VIII humano de longitud completa, y tiene al menos una identidad de aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con las regiones 1-740 y 1689-2332 de la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 1. En particular, se entiende que son tolerables diversas mutaciones y cambios conservadores de aminoácidos, así como ciertos cambios de aminoácidos no conservadores, siempre que la variante del Factor VIII tenga actividad coagulante. También se permiten fragmentos y ciertas glicosilaciones, y se prefieren, de hecho se permite cualquier cambio en todo el polipéptido del Factor VIII

siempre que el polipéptido conserve su actividad específica. Los solicitantes han descubierto por primera vez derivados del Factor VIII, en los que se ha eliminado o variado la región B, en los que las regiones de escisión con trombina en 740 y 1689 se mantienen intactas, pero que gran parte del área comprendida entre 740 y 1689 se puede delecionar, incluyendo 1648, sin causar ningún efecto negativo sobre la actividad específica de la variante del Factor VIII. Por lo tanto, estaría dentro de la competencia de una persona experta en la técnica realizar ciertas variaciones de la secuencia, conservando la actividad específica del Factor VIII.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "capaz de hibridarse en condiciones muy rigurosas" significa la hibridación de una cadena de ADN complementario con el ADN de interés en condiciones muy rigurosas. Del mismo modo, "capaz de hibridarse en condiciones poco rigurosas" se refiere a la hibridación de una cadena de ADN complementario con el ADN de interés en condiciones poco rigurosas. "Condiciones muy rigurosas" para el proceso de hibridación pueden implicar, por ejemplo, una temperatura elevada y/o un contenido bajo en sales, que deterioran los contactos por enlaces de hidrógeno entre pares de bases desapareadas. "Condiciones poco rigurosas" implicarían una temperatura más baja y/o una concentración en sales mayor que en las condiciones muy rigurosas. Tales condiciones permiten que dos hebras de ADN se hibriden si existe una complementariedad sustancial, aunque no casi completa entre las dos cadenas, como es el caso entre las hebras de ADN que codifican la misma proteína pero difieren en la secuencia debido a la degeneración del código genético. Unas condiciones con rigor apropiado que favorecen la hibridación del ADN, por ejemplo, 6x SSC a aproximadamente 45ºC, seguido de un lavado con 2x SSC a 50ºC, son conocidas por los expertos en la materia o bien se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1989), 6.31-6.3.6. Por ejemplo, la concentración en sales en la etapa de lavado se puede seleccionar desde poco rigurosa, aproximadamente 2x SSC a 50ºC, hasta muy rigurosa, aproximadamente 0,2x SSC a 50ºC. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde poco rigurosa a temperatura ambiente, aproximadamente 22ºC, hasta condiciones muy rigurosas, de aproximadamente 75ºC. Otros parámetros del rigor se describen en Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring N.Y., (1982), págs. 387-389; véase también Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, volumen 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, N.Y. págs. 8.46-8.47 (1989).

Tal y como se utiliza en esta memoria, "vehículos" incluye vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. Frecuentemente el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponado. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

Tal y como se usa en este documento, "derivados covalentes" incluyen modificaciones del polipéptido o de un fragmento del mismo con un agente de derivatización proteináceo o no proteináceo orgánico, y modificaciones posteriores a la traducción. Las modificaciones covalentes se introducen tradicionalmente haciendo reaccionar residuos de aminoácidos diana con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con residuos laterales o terminales seleccionados, o aprovechando los mecanismos de modificaciones posteriores a la traducción que actúan en células hospedadoras recombinantes, seleccionadas. Ciertas modificaciones posteriores a la traducción son el resultado de la acción de células hospedadoras recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos glutaminilo y asparaginilo se desaminan frecuentemente después de la traducción formando los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desamidan en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos puede estar presente en los polipéptidos del Factor VIII de la presente invención. Otras modificaciones posteriores a la traducción incluyen la glicosilación, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo, tirosina o treonilo, la metilación de grupos α-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)).

Tal como se utiliza en la presente memoria, "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para generar resultados clínicos o bioquímicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar una o varias veces. Para los fines de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, invertir, desacelerar o retrasar la progresión del estado de enfermedad. En una realización preferida de la invención, la "cantidad eficaz" se define como una cantidad de compuesto capaz de efectuar la coagulación de la sangre.

Tal y como se usa en este documento, "fragmento" se refiere a una parte de un polipéptido, que conserva características utilizables y funcionales. Por ejemplo, tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, el fragmento polipeptídico del Factor VIII tiene la función de coagular la sangre.

Tal y como se usa en este documento, "célula hospedadora" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser un receptor o ha sido un receptor de un vector de esta invención. Las células hospedadoras incluyen la

progenie de una sola célula hospedadora, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en la morfología o en el complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación y/o un cambio natural, accidental o deliberado. Una célula hospedadora incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* con un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor angiogénico.

Tal como se utiliza en esta memoria, "mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo los seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o animales domésticos, como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos y así sucesivamente. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Tal y como se usa en el presente documento, molécula "purificada" o "aislada" se refiere a moléculas biológicas que se retiran de su entorno natural y se aíslan o separan y están exentas de otros componentes con los que están asociadas de forma natural.

Tal y como se usa en el presente documento, "muestra" o "muestra biológica" se refiere en su sentido más amplio e incluye, cualquier muestra biológica obtenida a partir de un individuo, fluido corporal, línea celular, cultivo tisular o de otra fuente. Además, una "muestra biológica" obtenida a partir de un paciente se puede referir ya sea a una "muestra biológica" o a una "muestra del paciente".

Tal y como se usa en este documento, "identidad de secuencia", se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica natural después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los valores de % de identidad de secuencia se generan mediante el programa informático NCBI BLAST2.0, tal como ha sido definido por Altschul et al., (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Los parámetros se ajustan a los valores por defecto, con la excepción de la penalización por falta de coincidencia, que se establece en -1.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "actividad específica" o "actividad biológica específica" del polipéptido de FVIII se refiere a la medición cuantitativa de moléculas de FVIII funcionales con actividad coagulante, presentes en el total de moléculas de FVIII, que se representa por la relación de actividad coagulante de FVIII frente a la cantidad de antígeno de FVIII asociado con polipéptidos del Factor VIII. La actividad específica o la actividad biológica específica se ve afectada por múltiples factores tales como la potencia de la actividad coagulante, el perfil de activación con trombina, la estabilidad estructural y la conformación estructural, en comparación con el Factor VIII humano de longitud completa.

Tal y como se usa en este documento, "sujeto" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

Tal y como se usa en el presente documento, "tratamiento" es una metodología para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Dentro de los que requieren un tratamiento se incluye aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. "Paliar" una enfermedad significa que el grado y/o las manifestaciones clínicas indeseables de un estado de enfermedad disminuyen y/o el curso temporal de la progresión disminuye o se alarga, en comparación con una situación sin tratamiento.

Tal y como se utiliza en esta memoria, "vector", "vector polinucleotídico", "estructura artificial" y "estructura artificial polinucleotídica" se usan indistintamente en el presente documento. Un vector polinucleotídico de esta invención puede estar en cualquiera entre varias formas, incluyendo, pero no limitadas a, ARN, ADN, ARN encapsulado en un recubrimiento retrovírico, ADN encapsulado en un recubrimiento adenovírico, ADN empaquetado en otra forma vírica o de tipo vírica (tales como virus herpes simple y virus adenoasociado (AAV)), ADN encapsulado en liposomas, ADN que forma complejos con polilisina, que forma complejos con moléculas policatiónicas sintéticas, que forma complejos con compuestos tales como polietilenglicol (PEG) para "enmascarar" inmunológicamente la molécula y/o aumentar la semivida, o conjugado con una proteína no vírica. Preferiblemente, el polinucleótido es ADN. Tal y como se emplea en esta memoria, "ADN" incluye no solo las bases A, T, C y G, sino que también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases, tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces sin carga y tioatos, uso de análogos de azúcares, y estructuras de cadena principal modificada y/o alternativas, tales como poliamidas.

Polipéptidos del Factor VIII

Se proporcionan nuevas estructuras artificiales de ADN y nuevas composiciones que comprenden células hospedadoras que producen polipéptidos que tienen actividad de FVIII. Los polipéptidos que tienen actividad de FVIII inclu-

yen proteínas de FVIII mutantes por deleción en las que se deleciona una parte sustancial de la región central o "dominio B". Las estructuras artificiales plasmídicas que comprenden secuencias de ADN que codifican polipéptidos con deleción que tienen actividad de FVIII, se utilizan para transformar una célula hospedadora. La célula hospedadora transformada se cultiva a continuación, para expresar el gen. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota o procariota. El FVIII humano tiene la secuencia que se muestra en las Figuras 1A y 1B (SEQ ID NO: 1). La numeración de la secuencia de aminoácidos comienza con A-1, el primer aminoácido después de la secuencia señal de 19 aminoácidos. El último aminoácido del FVIII es Y-2332. Este esquema de numeración se utiliza en toda la memoria descriptiva.

Los polipéptidos de esta invención incluyen derivados de FVIII, es decir, compuestos que tienen al menos una secuencia de aminoácidos con una similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la forma natural de FVIII humano. Los derivados tienen por lo general un menor número de aminoácidos que la forma natural de FVIII humano.

Con el mayor conocimiento de los requisitos estructurales para la escisión y la activación de FVIII, hemos diseñado un FVIII funcional con el dominio B delecionado que se expresa y se secreta como un polipéptido de cadena sencilla a fin de aumentar el rendimiento de recuperación durante una preparación farmacéutica. Hemos sometido a ensayo la hipótesis de que la fusión del extremo N-terminal del dominio B con las secuencias de aminoácidos (desde Glu-1649 hasta Pro-1688) de la cadena ligera A3-C1-C2, produciría una sola molécula polipeptídica de FVIII. Tal como se describe en esta invención, algunos derivados de FVIII poseen perfiles de activación típicos con trombina, idénticos al de FVIII de tipo silvestre y una estabilidad estructural superior a la de FVIII de tipo silvestre, así como a la de otros derivados de FVIII con el dominio B delecionado. Además, la mayoría de los derivados tienen la ventaja añadida de ser expresados de manera más eficaz en células de mamífero. Esta invención ha mostrado que una molécula que carece de la mayor parte del dominio B y parte del dominio A3, pero que todavía conserva los sitios de maduración correspondientes a los aminoácidos 740 y 1689 (que parecen ser necesarios para la activación), muestra una actividad procoagulante normal. Esta molécula se puede activar mediante trombina de la misma manera que el FVIII humano natural. Nuevos polipéptidos de interés tendrán una fórmula, en mayor parte, que comprende una región N-terminal de cadena pesada, una región espaciadora de unión y una región C-terminal de cadena ligera. La representación esquemática de los derivados de FVIII con el dominio B delecionado se presenta en la Figura 2. La región N-terminal de la cadena pesada se caracteriza por tener una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia consecutiva encontrada en la secuencia de aminoácidos desde A-1 a R-740 del FVIII humano de longitud completa.

Los polipéptidos espaciadores de unión consisten en un grupo pequeño de secuencias de aminoácidos de unión que se corresponde sustancialmente a las secuencias de los dominios B y A3 (desde S-741 a P-1688) con una deleción interna de los aminoácidos 746 a 1649, 746 a 1652, 746 a 1655, 758 a 1649, 758 a 1652, 758 a 1655, 765 a 1649, 765 a 1652, 765 a 1655, 748 a 1658, 755 a 1658, 762 a 1658, 769 a 1658, 776 a 1658 o 783 a 1658.

La cadena ligera C-terminal se caracteriza por tener una secuencia de aminoácidos similar a una secuencia consecutiva desde R-1689 hasta Y-2332 que se encuentra en la secuencia de FVIII. Las variantes de esta invención, que representan deleciones internas con relación a la molécula de FVIII natural, contienen preferiblemente (i) una deleción interna descrita anteriormente; o (ii) deleciones de menos aminoácidos dentro de las regiones indicadas en (i). Otras variantes de esta invención que representan deleciones internas pueden contener deleciones de uno o varios aminoácidos entre R-1649 y P-1688 para fusionar cualquier secuencia de aminoácidos en los dominios A1, A2 y B. La Figura 2 muestra la representación ejemplar de los derivados de FVIII dB747 y dBN(45-50) que tienen una deleción interna de los aminoácidos 748 a 1658 y 746 a 1649, respectivamente, en comparación con FVIII humano.

Estos derivados de FVIII con el dominio B delecionado no conservan un sitio de procesamiento proteolítico intracelular, tal como el residuo Arg-1648, lo que da como resultado la generación de derivados de FVIII homogéneos que comprenden una población principal de polipéptidos de cadena sencilla. La eliminación del sitio de escisión de 80 kDa (R-1648) no disminuyó la actividad del factor VIII generada en el medio condicionado. Además, algunos derivados de esta invención no mostraron cambios significativos en el plegamiento de activación con trombina. Los presentes resultados en esta memoria mostraron que la eliminación de R-1648 no afectaba a la síntesis o a la secreción de los derivados de FVIII procedentes de la célula. Además, la especie predominante de FVIII producida era una molécula de cadena sencilla de aproximadamente 170 kDa, el resultado de la pérdida del sitio de procesamiento intracelular en el sitio de 80 kDa. Las variantes de FVIII de cadena sencilla pueden ser ventajosas porque se pueden producir de una forma más homogénea y pueden tener un perfil farmacocinético mejorado en relación con FVIII humano natural u otro FVIII recombinante.

En FVIII de longitud completa, la escisión con trombina después de los residuos de Arg 372, 740 y 1689, activa la actividad coagulante de FVIII. Esto coincide con la generación de un heterotrímero de FVIIIa que consiste en la subunidad A1 en una asociación dependiente de iones metálicos divalentes con la cadena ligera A3-C1-C2 escindida con trombina y una subunidad A2 libre, asociada con el dominio A1 a través de una interacción iónica. En el FVIII de longitud completa, la escisión después de Arg-1689 elimina una región rica en aminoácidos ácidos desde R-1648 a R-1689, y es necesaria para que FVIIIa se disocie de vWF y hace que FVIIIa esté disponible para la interacción con fosfolípidos. El análisis de las proteínas derivadas de FVIII radiomarcadas de esta invención después de la digestión con trombina, indicó una apariencia normal de los fragmentos de 73 kDa y 50 y 40 kDa (véase la Figura 5C). Este

resultado mostró que los derivados de FVIII descritos se pueden activar mediante trombina de la misma manera que la molécula natural completa. Tal y como se muestra en esta invención, estos derivados de FVIII muestran una activación típica con trombina que se correlaciona con la escisión después de Arg-372, Arg-740 y Arg-1689, generando un heterotrímero de FVIII activado que es idéntico a FVIII de tipo silvestre y también está sujeto a una inactivación rápida a través de la disociación de la subunidad del dominio A2 (véase la Figura 7).

Un aspecto de la invención se refiere a variantes en las que se genera un sitio de glicosilación artificial ligado a N mediante la fusión del aminoácido Asn en el dominio B con una secuencia de aminoácidos X-treonina o X-serina en el dominio A3, coincidiendo con la deleción de la secuencia interna tal y como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, una secuencia tripeptídica de la secuencia de reconocimiento de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido) en los sitios de fusión se puede generar ligando los aminoácidos 746, 758 y 765 situados junto al aminoácido Asn en las posiciones 745, 757 y 764, respectivamente, directamente con los aminoácidos Ser o Thr en las posiciones 1651, 1654 y 1657. Estas variantes de FVIII tendrán una deleción interna de los aminoácidos 747 a 1650, 747 a 1653, 747 a 1656, 759 a 1650, 759 a 1653, 759 a 1656, 766 a 1650, 766 a 1653 o 766 a 1656, en comparación con FVIII humano. Los sitios de glicosilación ligados a N de consenso contienen secuencias tripeptídicas con la fórmula asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina, en donde X puede ser generalmente cualquier aminoácido. En particular, en un aspecto de la invención, X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Variantes de este aspecto de la invención que contienen un sitio de glicosilación ligado a N modificado genéticamente en los sitios de fusión entre los dominios B y A3, pueden evitar que una secuencia de epítopo potencialmente nueva en el sitio de fusión se exponga al sistema inmune. Otro aspecto de la invención se refiere a derivados en los que uno o varios de los sitios de escisión del Factor Xa, APC y trombina se modifican para hacer que dichos sitios sean menos lábiles a una proteolisis específica. Un subgénero de los derivados de particular interés en la actualidad incluye los que contienen una modificación en P-739, en donde la fenilalanina se prefiere en la actualidad, pero se puede sustituir por un aminoácido diferente o eliminar. La síntesis y la secreción de los derivados de FVIII con una modificación del aminoácido en 739 en la invención, no se vieron afectadas. Estas variantes muestran una mayor tasa de activación con trombina que el FVIII de longitud completa, así como otros derivados de FVIII de esta invención (véase la Figura 7). El aumento de la actividad puede ser atribuible a la resistencia a la inactivación mediante la escisión del Factor Xa en el ensayo cromogénico. Por lo tanto, esta alteración parece generar una forma más estable de FVIII con el beneficio adicional de una mayor actividad. Sin embargo, se encontró que, de acuerdo con los documentos de Patentes de EE.UU. nº 5.422.260 y 5.451.521, un derivado de FVIII con el dominio B delecionado con la mutación de arginina a isoleucina en la posición 740, poseía menos actividad después de la mutación.

A pesar de que se puede suponer que todas las moléculas polipeptídicas de FVIII que se generan por la fusión de la región N-terminal del dominio B con las secuencias de aminoácidos (desde Glu-1649 hasta Pro-1688) de la cadena ligera A3-C1-C2 producirían un perfil similar de actividad procoagulante, derivados de FVIII individuales con el dominio B delecionado poseen un perfil de activación con trombina y una estabilidad estructural únicos en esta invención. Por lo tanto, hemos caracterizado detalladamente en esta invención la función molecular del derivado de FVIII individual con el dominio B delecionado para encontrar un derivado de FVIII con el dominio B delecionado, de cadena sencilla, activo y seguro con perfiles de activación con trombina similares y una productividad mejorada.

Ácido nucleico que codifica el polipéptido del Factor VIII

Por secuencia polinucleotídica "aislada", se entiende que incluye una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido retirada de su entorno natural. Esta incluye segmentos de ADN que codifican el polipéptido de FVIII de la presente invención, y puede comprender además secuencias heterólogas, tales como secuencias de vectores o de otro ADN extraño. Por ejemplo, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención, las cuales se pueden purificar parcial o sustancialmente.

Además, moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención incluyen moléculas de ADN, que comprenden una secuencia sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, ya sea debido a la degeneración del código genético o a otra variabilidad, todavía codifican el polipéptido de FVIII de la invención. Por lo tanto, para un experto en la técnica sería rutinario generar las variantes descritas anteriormente, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones o la función general en un hospedador particular.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una porción de un polinucleótido en una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente. Los polinucleótidos que se hibridan son útiles como sondas y cebadores, tal y como se ha descrito anteriormente. Las porciones de un polinucleótido que se hibrida con la secuencia que codifica el polipéptido de FVIII, se pueden especificar con precisión por las posiciones 5' y 3' de las bases o por el tamaño en bases de nucleótidos tal y como se ha descrito anteriormente, o excluir con precisión de la misma manera. Del mismo modo, porciones de un polinucleótido que se hibridan con el polipéptido de FVIII, se pueden usar también como sondas y cebadores. Los polinucleótidos preferidos que se hibridan de la presente invención son aquellos que, cuando se marcan y se utilizan en un ensayo de hibridación conocido en la técnica (por ejemplo, análisis por transferencia Southern y Northern), muestran la mayor intensidad de la señal, independientemente de otras secuencias heterólogas presentes en cantidades equimolares. En la selección de una célula hospedadora preferida para la transfección con los vectores de la invención, que comprenden secuencias de ADN que codifican

derivados de FVIII y, por ejemplo, la proteína dihidrofolato reductasa (DHFR), es apropiado seleccionar el hospedador de acuerdo con el tipo de proteína DHFR empleada. Si se emplea proteína DHFR de tipo silvestre, es preferible seleccionar una célula hospedadora que carezca de DHFR, permitiendo así el uso de la secuencia codificadora de DHFR como marcador de una transfección con éxito en medio selectivo que carece de hipoxantina, glicina y timidina.

Por otro lado, si se utiliza la proteína DHFR con baja afinidad de unión con metotrexato (MTX) como secuencia reguladora, no es necesario utilizar células resistentes a DHFR. La DHFR mutante es resistente al MTX, por lo tanto, los medios que contienen MTX se pueden utilizar como medios de selección con la condición de que las propias células hospedadoras sean sensibles a MTX. Alternativamente, un gen DHFR de tipo silvestre se puede emplear como marcador de la amplificación en una célula hospedadora que no carezca de DHFR, siempre que se emplee un segundo marcador seleccionable del fármaco, tal como la resistencia a la higromicina. Los ejemplos que se exponen describen el uso de células CHO (células CHO-DBX11) resistentes a MTX como células hospedadoras y vectores de expresión que emplean el promotor de CMV y SV40 como secuencias reguladoras para dirigir la expresión de los derivados de FVIII y de DHFR, respectivamente.

Polinucleótidos variantes y mutantes

Variantes de ácidos nucleicos de este tipo incluyen las producidas por sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Alteraciones en la secuencia de aminoácidos pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, conservadoras o no conservadoras. Especialmente preferidas entre éstas son las sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y las actividades de los polipéptidos de la presente invención o de porciones de los mismos. También se prefieren a este respecto las sustituciones conservadoras.

La invención permite el uso de secuencias en vectores de expresión, así como para transfectar células hospedadoras y líneas celulares, siendo éstas células, procariotas o eucariotas. La invención también permite la purificación de los polipéptidos expresados a partir del vector de expresión. El vector de expresión puede contener diversos marcadores moleculares para facilitar la purificación. Posteriormente, la estructura artificial de expresión obtenida puede transformarse en cualquier célula hospedadora elegida. Los lisados celulares procedentes de la célula hospedadora se aíslan por métodos establecidos, bien conocidos en la técnica.

Polipéptidos variantes y mutantes

Para mejorar o alterar las características del polipéptido de FVIII de la presente invención, se pueden emplear aminoácidos modificados genéticamente. La tecnología de ADN recombinante conocida por los expertos en la técnica se puede utilizar para crear nuevos polipéptidos mutantes incluyendo sustituciones, deleciones, adiciones de aminoácidos únicas o múltiples, o proteínas de fusión. Tales polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, un aumento/disminución de la actividad o un aumento/disminución de la estabilidad. Además, se pueden purificar con mayor rendimiento y muestran una solubilidad mejor que el polipéptido natural correspondiente, al menos bajo ciertas condiciones de purificación y almacenamiento.

Anticuerpos

En una realización, la presente invención se dirige a la detección de la presencia de un polipéptido de FVIII usando una variedad de métodos de detección. Una forma de detectar un polipéptido del Factor VIII es marcar un ligando que se une específicamente al polipéptido de FVIII. Un ligando de este tipo puede ser un anticuerpo. El polipéptido de FVIII purificado se puede utilizar para producir un anticuerpo monoclonal o policlonal. Los fragmentos de polipéptido del Factor VIII también se pueden utilizar para producir un anticuerpo monoclonal o policlonal. Un anticuerpo monoclonal o policlonal obtenido posteriormente se puede utilizar para determinar la presencia de un polipéptido de FVIII en diversas muestras que incluyen células, tejidos y fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma y orina, pero no limitados a los mismos. El polipéptido de FVIII se puede someter a ensayo usando una variedad de métodos biológicos moleculares, que incluyen hibridación *in situ*, inmunoprecipitación, tinción inmunofluorescente, análisis por transferencia Western y así sucesivamente, pero no se limitan a los mismos. Se puede llevar a cabo un ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal contra un polipéptido de FVIII para determinar la cantidad de polipéptido de FVIII en la muestra biológica, incluyendo fluidos corporales de seres humanos que se cree que padecen un trastorno de la coagulación de la sangre, tal como la hemofilia.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención), y fragmentos que se unen a epítopos de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo", tal y como se usa en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos de diferentes epítopos de un polipéptido de la presente invención o pueden ser específicos tanto de un polipéptido de la presente invención como de un epítopo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Los anticuerpos de la presente invención se pueden describir o especificar en términos del epítopo(s) o de la porción(es) de un polipéptido de la presente invención, que reconocen o se unen específicamente. El epítopo(s) o la porción(es) de polipéptido se puede especificar tal y como se describe en esta memoria, por ejemplo, por el sitio de glicosilación, las posiciones N-terminales y C-terminales o por el tamaño de los residuos de aminoácidos contiguos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, pero no de forma limitada, para purificar, detectar y dirigirse a los polipéptidos de la presente invención, incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de polipéptido de FVIII de la presente invención en muestras biológicas.

Tal y como se describe con más detalle a continuación, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos además pueden estar fusionados de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N-terminal o C-terminal o estar conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente descripción se pueden fusionar o conjugar de forma recombinante con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y con moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden generar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos policlonales para un antígeno de interés se pueden producir por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede administrar a diversos animales hospedadores incluyendo, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos del antígeno. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Tales adyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica. La expresión "anticuerpo monoclonal" tal y como se emplea en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el cual se ha producido.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitativo, los ratones se pueden inmunizar con un polipéptido del Factor VIII o con una célula que expresa dicha entidad. Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos del antígeno en el suero del ratón, se extirpa el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan a continuación mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada. Los clones del hibridoma se someten entonces a ensayo por métodos conocidos en la técnica para detectar las células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención o a su complejo con su ligando. El líquido ascítico, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

Los anticuerpos también se pueden fijar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o para la purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

Ensayos para la unión de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención se pueden someter a ensayo para estudiar la unión inmunoespecífica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a sistemas de ensayos competitivos y no competitivos, usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por mencionar solo algunos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., compiladores, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Los inmunoensayos a modo de ejemplo se describen brevemente a

continuación, sin que sean una forma de limitación.

Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (1% de NP-40 o Triton X-100, 1% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, 1% de Trasylol) suplementado con fosfatasa proteica y/o inhibidores de la proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadiendo el anticuerpo de interés al lisado celular, incubando durante un período de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4ºC, añadiendo perlas de sefarosa de proteína A y/o de proteína G al lisado celular, incubando durante aproximadamente una hora o más a 4ºC, lavando las perlas en tampón de lisis y resuspendiendo las perlas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular se puede evaluar, por ejemplo, mediante un análisis de transferencia Western. Un experto en la materia sabrá cómo se pueden modificar los parámetros para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el ruido de fondo (por ejemplo, aclarando previamente el lisado celular con perlas de sefarosa). Para una exposición adicional de los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Ausubel et al., compiladores, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en 10.16.1.

El análisis mediante transferencia Western generalmente comprende preparar muestras de proteína, electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, 8%-20% de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína desde el gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (por ejemplo, PBS con 3% de BSA o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o una molécula radiactiva (por ejemplo, ^{32}P o ^{125}I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la materia sabrá cómo se pueden modificar los parámetros para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una exposición adicional de los protocolos de transferencia Western, véase, por ejemplo, Ausubel et al., compiladores, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en 10.8.1.

Los ELISAs comprenden preparar el antígeno, que puede incluir una muestra que comprende el polipéptido del Factor VIII, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un período de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ELISAs, el anticuerpo de interés no se tiene que conjugar con un compuesto detectable; en cambio, un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable, se puede añadir al pocillo. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el pocillo puede estar recubierto con el anticuerpo. En este caso, un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable se puede añadir simultáneamente o después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia sabrá cómo se pueden modificar los parámetros para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISAs, conocidas en la técnica. Para una exposición adicional en relación con los ELISAs véase, por ejemplo, Ausubel et al., compiladores, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en 11.2.1.

Terapia génica

En una realización específica, secuencias que comprenden ácidos nucleicos que codifican el polipéptido del Factor VIII se administran para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o un trastorno asociado con una expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la invención, a modo de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada administrando a un sujeto un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que es mediadora de un efecto terapéutico.

Cualquiera de los métodos disponibles en la técnica para terapia génica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Los métodos ejemplares se describen a continuación.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIBTECH 11(5):155-215 (1993). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel et al. (compiladores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990). En un aspecto preferido, las secuencias de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido del Factor VIII, en el que las secuencias de ácido nucleico forman parte de vectores de expresión que expresan los polipéptidos en un hospedador adecuado. En particular, tales secuencias de ácido nucleico tienen promotores ligados funcionalmente a la región codificadora del polipéptido, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias que codifican el polipéptido y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo una expresión intracro-

mosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989).

La entrega de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente es expuesto directamente al ácido nucleico o a vectores portadores del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro* y, a continuación, se trasplantan al paciente. Estas dos metodologías se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, en donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr por cualquiera entre numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolas de modo que se vuelven intracelulares, por ejemplo, mediante infección usando vectores retrovíricos defectuosos o atenuados u otros vectores víricos, o mediante una inyección directa de ADN desnudo, o recubriendo con lípidos o receptores la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolas ligadas a un péptido que es conocido por entrar en el núcleo, administrándolas ligadas a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)) (que se pueden utilizar para dirigirse a tipos celulares que expresan específicamente los receptores), y así sucesivamente. En otra realización, se pueden formar complejos de ácido nucleico-ligando en donde el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para destruir endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En aún otra realización, el ácido nucleico se puede dirigir *in vivo* para la captación y la expresión específica en células, dirigiéndolo a un receptor específico. Alternativamente, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula hospedadora para expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

En una realización específica, se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido que se va a utilizar en la terapia génica, se clonan en uno o varios vectores, lo que facilita la entrega del gen a un paciente. Los vectores retrovíricos, vectores adenovíricos y virus adenoasociados son ejemplos de vectores víricos que se pueden utilizar. Los vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para un correcto empaquetamiento del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedadora.

Otra metodología para la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Por lo general, el método de transferencia incluye la transferencia a las células de un marcador seleccionable. Las células se seleccionan después para aislar aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Esas células se entregan a continuación a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos y así sucesivamente. Se conocen numerosos métodos en la técnica para la introducción de genes ajenos en las células y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, siempre que no se afecte a las funciones necesarias de desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe proporcionar una transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que la célula puede expresar el ácido nucleico y se puede heredar y expresar preferiblemente en su progenie celular.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico a los efectos de la terapia génica, comprenden cualquier tipo celular deseado, disponible, e incluyen pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, tal como se obtienen a partir de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, y así sucesivamente.

En una realización preferida, la célula empleada para la terapia génica es autóloga para el paciente.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido se introducen en las células de tal manera que son expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran luego *in vivo* para el efecto terapéutico. En una realización específica, se utilizan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que se puede aislar y mantener *in vitro* se puede utilizar potencialmente de acuerdo con esta realización de la presente invención.

En una realización específica, el ácido nucleico que se va a introducir para los fines de terapia génica comprende un promotor inducible ligado funcionalmente a la región codificadora, de tal manera que la expresión del ácido nucleico se puede vigilar, controlando la presencia o ausencia del inductor apropiado de la transcripción.

Composición terapéutica

En una realización, la presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades de la coagulación de la sangre. De esta manera, el compuesto terapéutico de la invención se puede administrar a pacientes humanos que padecen o son propensos a padecer la enfermedad, proporcionando compuestos que estimulan la coagulación de la sangre. En particular, la enfermedad puede ser la hemofilia, en particular, la hemofilia A.

La formulación de compuestos terapéuticos se conoce generalmente en la técnica y se puede hacer referencia convenientemente a Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., EE.UU. Por ejemplo, se puede administrar desde aproximadamente 0,05 µg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal al día. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas o la dosis se puede reducir proporcionalmente según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica. El compuesto activo se puede administrar de una manera conveniente tal como por vía oral, intravenosa (cuando son hidrosolubles), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o supositorio o mediante un implante (por ejemplo, utilizando moléculas de liberación lenta por la vía intraperitoneal o empleando células, por ejemplo, monocitos o células dendríticas sensibilizadas *in vitro* y transferidas de forma pasiva al receptor). Dependiendo de la vía de administración, se puede requerir que el péptido esté recubierto con un material para protegerlo de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dichos ingredientes.

Por ejemplo, la baja lipofilicidad de los péptidos les permitirá que sean destruidos en el tracto gastrointestinal por enzimas capaces de escindir enlaces peptídicos y en el estómago por hidrólisis ácida. Con el fin de administrar los péptidos por otra vía distinta a la administración parenteral, se pueden recubrir o administrar con un material que evite su inactivación. Por ejemplo, los péptidos se pueden administrar en un adyuvante, coadministrar con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Los adyuvantes contemplados en esta memoria incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como éter oleílico de polioxietileno y éter n-hexadecílico de polietileno. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEP) y Trasylol. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua-en-aceite-en-agua, así como liposomas convencionales.

Los compuestos activos también se pueden administrar por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol líquido, polietilenglicoles y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que tenga una capacidad de ser inyectada cómoda. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe proteger contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido, en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, con otros ingredientes diversos mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos estériles en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una solución de la misma filtrada previamente de forma estéril.

Cuando los péptidos están adecuadamente protegidos tal y como se ha descrito anteriormente, el compuesto activo se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede estar incluido en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o se puede prensar en forma de comprimidos, o se puede incorporar directamente en el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas ingeribles y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 1% en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar, por supuesto, y puede estar convenientemente entre aproximadamente 5 a aproximadamente 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones preferidas de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una forma unitaria de dosificación oral contiene entre aproximadamente 0,1 µg y

2000 mg de compuesto activo.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina se puede añadir o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o un elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y en formulaciones de liberación sostenida.

Tal y como se emplea en esta memoria, "vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas, es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, está contemplado su uso en las composiciones terapéuticas. Ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal y como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Los requisitos de las formas unitarias de dosificación de la invención se prescriben y dependen directamente de (a) las características únicas del material activo y del efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formular tal material activo para el tratamiento de una enfermedad en sujetos vivos que tienen un estado de enfermedad en el que la salud corporal está alterada.

El ingrediente activo principal se formula para que tenga una administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo aceptable, farmacéuticamente adecuado en forma de dosificación unitaria. Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el compuesto activo principal en cantidades que van desde 0,5 µg a aproximadamente 2000 mg. Expresado en proporciones, el compuesto activo está presente generalmente desde aproximadamente 0,5 µg/ml de vehículo. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan haciendo referencia a la dosis habitual y a la manera de administración de dichos ingredientes.

Sistemas de entrega

Se conocen diversos sistemas de entrega y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retrovírico o de otro tipo, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central a través de cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los compuestos o las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que requiere tratamiento, lo que puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante una intervención, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de una intervención, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una proteína, que incluye un anticuerpo o un péptido de la invención, se debe tener cuidado de usar materiales a los que la proteína no se absorba. En otra realización, el compuesto o la composición se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma. En aún otra realización, el compuesto o la composición se puede entregar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba. En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos.

En aún otra realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica.

Una composición se dice que es "farmacológica o fisiológicamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un animal receptor y es adecuada de otra manera para la administración a ese animal. Tal agente se dice que se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor.

El cultivo de células de mamífero es el método preferido para la expresión de ADN exógeno para producir los derivados de FVIII humano funcionales descritos en esta invención. En particular, las células de mamífero comunes que se utilizan para la producción de proteínas recombinantes, como las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), la línea celular de riñón de hámster recién nacido (BHK), las líneas celulares COS y la línea celular de riñón canino Madin Darby (MDCK), son de interés. Los vectores de expresión para tales células incluyen ordinariamente (si es necesario) un(os) origen(es) de replicación, un promotor localizado delante del gen que se va a expresar, junto con cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, sitios de corte y empalme de ARN, sitio de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción.

Para el uso en células de mamífero, las funciones reguladoras de los vectores de expresión se pueden suministrar con material vírico. Por ejemplo, promotores utilizados comúnmente se obtienen a partir del factor-1 de elongación (EF-1), virus de simio 40 (SV40) y lo más particularmente citomegalovirus (CMV). Además, también es posible, y frecuentemente deseable, utilizar secuencias promotoras o reguladoras asociadas normalmente con la secuencia génica deseada, siempre que tales secuencias reguladoras sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, para los expertos en la técnica serán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento, a partir de la descripción anterior y de las figuras que se acompañan. Se pretende que tales modificaciones queden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - Clonación de ADNc de FVIII de longitud completa

La transcripción inversa se realizó usando un cebador específico de un gen (F8B10, 5'AGCACAAAGGTAGAAGGCAAGC3' (SEQ ID NO: 2)), que incluye los nucleótidos 7237-7258 de la secuencia publicada (número de orden de GenBank: NM 00132). Brevemente, 50 µg de ARNm de hígado humano, 1 µl de 10X tampón de transcripción inversa, 1 µM de cebador F8B10, dNTPs 4 mM, 1 unidad de inhibidor de ARNasa y 10 unidades de transcriptasa inversa, se añadieron a una mezcla de reacción de volumen total 9,5 µl. A continuación, la reacción se incubó durante 90 min a 42ºC. El ADNc sintetizado se amplificó mediante un protocolo estándar de PCR utilizando la polimerasa pfu y los tres grupos de cebadores específicos de genes. El primer grupo de cebadores incluye los nucleótidos 133-1997 de la secuencia publicada (número de orden de GenBank: NM 00132) : F8FD (FW, 5'CCTTTTGCTTCTCCAGTTGAAC3' (SEQ ID NO: 3)) y F8BD (BW, 5'TTCTCTGTGAGGTACCAGCTTC3' (SEQ ID NO: 4)). El segundo y el tercer grupo de cebadores incluyen los nucleótidos 1810-4295 y 4044-7320, respectivamente: F8FC (FW 5'TGCCTGACCCGCTATTACTCTA3' (SEQ ID NO: 5)) y F8BB (BW, 5'TCTATCTGTGTGAGGGTGCTCG3' (SEQ ID NO: 6)); F8FA (FW 5'GGAGGAAGAAAACTTGGAAGGC3' (SEQ ID NO: 7)) y F8B10 (véase la Figura 3). La PCR se realizó empleando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 95ºC durante 1' 30", 45 ciclos de amplificación (a 95ºC durante 30 s, a 56ºC durante 30 s y a 68ºC durante 6 min) y 1 ciclo de extensión a 68ºC durante 10 min.

Tal y como se representa esquemáticamente en la Figura 3, los fragmentos amplificados se subclonaron en el vector pCR2.1 TOPO. Tres fragmentos subclonados se unieron a continuación al vector pCR2.1 TOPO usando KpnI y NsiI como sitios de restricción únicos. Después de unir los tres fragmentos, el sitio KpnI interno en la región que codificaba FVIII se eliminó por mutación silenciosa, y el sitio NsiI en el sitio de clonación múltiple de pCR2.1 TOPO fue sustituido por ClaI, con el fin de retirar el ADNc de FVIII de longitud completa unido mediante digestión con KpnI y ClaI. Dos sitios de enzimas de restricción, XbaI y NotI, se eliminaron de la cadena principal del vector pCR2.1 para otros fines de clonación. Este vector modificado fue denominado pCR2-full-length FVIII.

EJEMPLO 2 - Construcción de plásmidos portadores de ADNc de los derivados de FVIII que tienen deleciones en las regiones correspondientes a los dominios B y A3

Ejemplo 2A - Construcción de plásmidos para los derivados de FVIII con el dominio B delecionado con un espaciador de tamaño diverso que une el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada con el extremo amino-terminal de la cadena ligera

El plásmido de partida, pCR2.1-fullFVIII, contiene el ADNc del Factor VIII de longitud completa, nucleótidos 133 a 7320. pCR2.1-fullFVIII se digirió con EcoNI para eliminar los nucleótidos 2783 hasta 4804 del FVIII de longitud com-

pleta. Los extremos cohesivos del vector digerido con EcoNI se volvieron romos mediante el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I para la ligación. Este vector ligado se denominó pCR2.1-deltaEcoNI_FVIII y se utilizó como un molde para una mutagénesis por deleción adicional, precisa.

Los cebadores oligonucleotídicos fueron diseñados para realizar una serie de deleciones precisas en marco. Cada cebador se empareja con las secuencias que flanquean ambos lados de los segmentos que se van a eliminar. Los cebadores delta-747, delta-754, delta-761, delta-768, delta-775 y delta-782 generan los sitios de fusión de Arg747-Gln1659, Lys754-Gln1659, Ile761-Gln1659, Lys768-Gln1659, His775-Gln1659 e Ile782-Gln1659, que son respectivamente:

(delta-747: 5'-CTTCTCCCAGAATTCAAGACAAGAGGAAATTGACTATG-3' (SEQ ID NO:8));

(delta-754: 5'-CCTAGCACTAGGCAAAAGCAAGAGGAAATTGACTATG-3' (SEQ ID NO:9));

(delta-761: 5'-CAATTTAATGCCACCACAATTCAAGAGGAAATTGACTATG-3' (SEQ ID NO:10));

(delta-768: 5'-CAGAAAATGACATAGAGAAGCAAGAGGAAATTGACTATG-3' (SEQ ID NO:11));

(delta-775: 5'-GACCCTTGGTTTGCACACCAAGAGGAAATTGACTATG-3' (SEQ ID NO:12));

(delta-782: 5'-GCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAGAGGAAATTGACTATGATGATACC-3' (SEQ ID NO: 13)).

Además de los cebadores mutagénicos descritos anteriormente, un cebador de selección (5'-CGTGATCCATGTCGACGCCTGCTTGCC-3' (SEQ ID NO: 14)) que cambia el único sitio original NcoI por SalI, se utilizó para la mutagénesis dirigida al sitio con el plásmido pCR2.1-deltaEcoNI_FVIII como molde. La digestión por restricción se llevó a cabo para seleccionar los clones positivos, que fueron verificados adicionalmente mediante secuenciación. Los clones finalmente verificados se denominaron dB747, dB754, dB761, dB768, dB775 y dB782, respectivamente.

Ejemplo 2B - Generación de plásmidos que contienen una nueva secuencia de N-glicano en los sitios de fusión

Para evitar la exposición de un nuevo epítopo con una secuencia de aminoácido no natural, en la región de unión de la cadena pesada y la cadena ligera, creamos una secuencia de reconocimiento de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr en la que X puede ser cualquier aminoácido) en los sitios de fusión, uniendo Asn en las posiciones 745, 757 y 764 del dominio B, a aminoácidos en las posiciones 1650, 1653 y 1656 situados cerca de aminoácidos Ser o Thr en las posiciones 1651, 1654 y 1657, que generan un sitio de glicosilación ligado a N en los sitios de fusión. Los cebadores de oligonucleótidos se diseñaron para realizar una serie de deleciones precisas en marco. pCR2.1-deltaEcoNI_FVIII se utilizó como molde para una mutagénesis precisa por deleción adicional. Cada cebador se empareja con las secuencias que flanquean ambos lados de los segmentos que se van a eliminar. Los cebadores N-745-1650, N-745-1653, N-745-1656, N-757-1650, N-757-1653, N-757-1656, N-764-1650, N-764-1653 y N-764-1656 generan los sitios de fusión Asn745-Ile1650, Asn745-Thr1653, Asn745-Gln1656, Asn757-Ile1650, Asn757-Thr1653, Asn757-Gln1656, Asn764-Ile1650, Asn764-Thr1653 y Asn764-Gln1656. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores de oligonucleótidos son las siguientes:

(N-745-1650: 5'-CAAGAAGCTTCTCCCAGAAAATAACTCGTACTACTCTTC-3' (SEQ ID NO:15));

(N-745-1653: 5'-CAAGAAGCTTCTCCCAGAAAACTACTCTTCAGTCAGTC-3' (SEQ ID NO:16));

(N-745-1656: 5'-CAAGAAGCTTCTCCCAGAAACAGTCAGATCAAGAGGAAATTG-3' (SEQ ID NO:17));

(N-757-1650: 5'-CTAGGCAAAAGCAATTTAATATAACTCGTACTACTCTTC-3' (SEQ ID NO:18));

(N-757-1563: 5'-CTAGGCAAAAGCAATTTAATACTACTCTTCAGTCAGTC-3' (SEQ ID NO:19));

(N-757-1656: 5'-CTAGGCAAAAGCAATTTAATCAGTCAGATCAAGAGGAAATTG-3' (SEQ ID NO:20));

(N-764-1650: 5'-CACCACAATTCCAGAAAATATAACTCGTACTACTCTTC-3' (SEQ ID NO:21));

(N-764-1653: 5'-CACCACAATTCCAGAAAATACTACTCTTCAGTCAGTC-3' (SEQ ID NO:22));

(N-764-1656: 5'-CACCACAATTCCAGAAAATCAGTCAGATCAAGAGGAAATTG-3' (SEQ ID NO:23)).

Además de los cebadores mutagénicos descritos anteriormente, un cebador de selección (5'-CGTGATCCATGTCGACGCCTGCTTGCC-3' (SEQ ID NO: 24)), que cambia el único sitio original de NcoI por SalI, se utilizó para la mutagénesis dirigida al sitio usando el plásmido pCR2.1-deltaEcoNI_FVIII como molde. La digestión por restricción se llevó a cabo para seleccionar los clones positivos, que fueron verificados adicionalmente mediante una secuenciación. Los clones verificados finalmente se denominaron dBN(45-50), dBN(45-53), dBN(45-56), dBN(57-50), dBN(57-53), dBN(57-56), dBN(64-50), dBN(64-53) y dBN(64-56), respectivamente.

Ejemplo 3 - Expresión de los derivados de FVIII en células de mamífero

Ejemplo 3A - Construcción de vectores de expresión de mamífero

De los plásmidos dB747, dB754, dB761, dB768, dB775, dB782, dB761-739F, dB783-739F, dBN(45-50), dBN(45-53), dBN(45-56), dBN(57-50), dBN(57-53), dBN(57-56), dBN(64-50), dBN(64-53) y dBN(64-56) se escindió la secuencia de ADNc de los derivados del Factor VIII, se establecieron extremos romos y se clonaron entre el promotor de citomegalovirus (CMV) y las secuencias de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGHpA). En todas las estructuras artificiales, la orientación de los insertos se verificó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

Ejemplo 3B - Transfección transitoria de estructuras artificiales para la expresión en mamífero en células BHK21

Las células BHK21 se obtuvieron a partir de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvieron en EMEM complementado con suero bovino fetal al 10%. El día antes de la transfección, las células se sembraron en seis placas de cultivo tisular de seis pocillos con una densidad tal que las células alcanzaron un 70-80% de confluencia en el momento de la transfección. En las transfecciones se utilizó un reactivo a base de liposomas. Cada transfección se realizó usando 1 µg de ADN de la estructura artificial para expresión del derivado de FVIII y 30 ng de un plásmido de control interno pSV β-galactosidasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Cuatro horas después de la transfección, se retiró el medio de transfección por aspiración, se añadieron 2 ml de medio completo y las placas se devolvieron a la incubadora. Veinticuatro horas después de la transfección, el medio se retiró, se centrifugó y se congeló a -80ºC. Los lisados celulares se prepararon y se midió la actividad β-galactosidasa en los lisados celulares usando el kit Galacto-Light Plus (Tropix, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad β-galactosidasa, expresada desde un plásmido de control interno pSV β-galactosidasa, proporcionó un control interno para vigilar la eficacia de la transfección. La actividad de FVIII se normalizó basándose en la actividad β-galactosidasa en cada pocillo. Un ensayo ELISA se utilizó para determinar el nivel de antígeno de FVIII presente en muestras del medio (por triplicado). La actividad procoagulante del Factor VIII (FVIII:C) se cuantificó en medio de cultivo (por triplicado) utilizando el ensayo cromogénico Coatest de FVIII (Chromogenix, Molndal, Suecia).

Los resultados se presentan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Determinación del nivel de antígeno de FVIII (FVIII:Ag) y de la actividad procoagulante de FVIII (FVIII:C) en el material sobrenadante de cultivos de BHK21 transfectados con el vector de expresión derivado de FVIII, 24 h después de la transfección (resultados expresados en mU/ml o %/ml)

Derivado	FVIII:Ag (mU/ml)	FVIII:C (%/ml)	Actividad específica[a]
dB-747	77,8 ± 5,92	7,1 ± 0,61	0,09
dB-754	89,9 ± 5,16	8,8 ± 0,28	0,10
dB-761	72,8 ± 10,27	8,3 ± 0,54	0,11
dB-768	85,6 ± 1,17	9,2 ± 0,44	0,11
dB-775	75,5 ± 7,93	7,5 ± 0,32	0,10
dB-782	76,3 ± 4,66	7,7 ± 0,46	0,10
FVIII de longitud completa	5,2 ± 0,72	0,2 ± 0,01	0,04

[a] Calculada dividiendo los valores de FVIII:C por los valores de FVIII:Ag

Tabla 2

Determinación del nivel de antígeno de FVIII (FVIII:Ag) y de la actividad procoagulante de FVIII (FVIII:C) en el material sobrenadante de cultivos de BHK21 transfectados con el vector de expresión derivado de FVIII, 24 h después de la transfección (resultados expresados en mU/ml o %/ml)

Derivado	FVIII:Ag (mU/ml)	FVIII:C (%/ml)
dBN(45-50)	81,4 ± 5,72	7,2 ± 0,73
dBN(45-53)	98,9 ± 2,57	8,4 ± 0,23

Determinación del nivel de antígeno de FVIII (FVIII:Ag) y de la actividad procoagulante de FVIII (FVIII:C) en el material sobrenadante de cultivos de BHK21 transfectados con el vector de expresión derivado de FVIII, 24 h después de la transfección (resultados expresados en mU/ml o %/ml)		
Derivado	FVIII:Ag (mU/ml)	FVIII:C (%/ml)
dBN(45-56)	88,6 ± 6,37	7,2 ± 0,75
dBN(57-50)	87,9 ± 11,1	8,1 ± 0,37
dBN(57-53)	82,4 ± 3,24	7,3 ± 0,54
dBN(57-56)	86:5 ± 8,15	7,6 ± 0,69
dBN(64-50)	87,4 ± 7,38	8,2 ± 0,53
dBN(64-53)	80,7 ± 5,56	7,5 ± 0,64
dBN(64-56)	84,9 ± 3,42	7,9 ± 0,41
FVIII de longitud completa	5,5 ± 0,53	0,3 ± 0,06

Los resultados muestran que los derivados de FVIII que se han sometido a deleción son biológicamente activos en un ensayo de coagulación sanguínea, y que los niveles más altos de proteína se obtuvieron con las estructuras artificiales de derivados de FVIII, más que con el FVIII de longitud completa. Además, la relación FVIII:C y FVIII:Ag para los derivados de esta invención es mayor que la de FVIII de longitud completa, lo que indica que los derivados de FVIII pueden ser más estables después de la secreción en medios de cultivo. Tal y como se muestra en la Tabla 3, los incrementos en la actividad de FVIII (FVIII:C) de los derivados de FVIII recombinante a lo largo del tiempo, después de la incubación, eran más elevados que en comparación con los de FVIII de longitud completa recombinante.

Ejemplo 4 - Sustitución de Pro por Phe en la posición 739

Pro739 en las variantes de FVIII con el dominio B delecionado descritas anteriormente, se modificó utilizando el método de mutagénesis dirigida al sitio. Un cebador oligonucleotídico (5'-AACAATGCCATTGAATTCAGAAGCTTCTCCCAG-3' (SEQ ID NO: 25)) fue diseñado para introducir la sustitución de Pro por Phe en la posición 739. Los procedimientos de mutagénesis en su totalidad fueron idénticos al Ejemplo 2 descrito anteriormente. Los vectores que poseían una sustitución Pro739Phe en cada derivado de FVIII con el dominio B delecionado, se denominaron dB747-739F, dB754-739F, dB761-739F, dB768-739F, dB775-739F, dB782-739F, dBN(45-50)-739F, dBN(45-53)-739F, dBN(45-56)-739F, dBN(57-50)-739F, dBN(57-53)-739F, dBN(57-56)-739F, dBN(64-50)-739F, dBN(64-53)-739F y dBN(64-56)-739F, respectivamente. Los ADNs resultantes se clonaron en el vector de expresión de mamífero, se prepararon, se transfectaron y las muestras resultantes se sometieron a ensayo tal como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Tabla 4, se observó que dB761-739F y dB782-739F generaban más actividad que dB761 y dB782, respectivamente, aumentaban la actividad después de la mutación de la prolina a una fenilalanina en la posición 739.

Tabla 3

Determinación de la actividad procoagulante de FVIII (FVIII:C) en el material sobrenadante de cultivos de BHK21 transfectados con el vector de expresión derivado de FVIII, 24 h y 48 h después de la transfección (resultados expresados en %/ml)		
Derivado	24 h	48 h
dB-747	7,8 ± 0,09	15,9 ± 0,85
dB-754	9,0 ± 0,28	17,9 ± 0,43
dB-761	8,0 ± 0,22	16,0 ± 0,69
dB-768	7,7 ± 0,31	18,0 ± 0,19
dB-775	7,3 ± 0,44	14,9 ± 0,34
dB-782	6,2 ± 0,12	14,2 ± 0,91
FVIII de longitud completa	0,3 ± 0,09	0,2 ± 0,06

Tabla 4

Determinación de la actividad procoagulante de FVIII (FVIII:C) en el material sobrenadante de células HEK293 transfectadas de forma estable con el vector de expresión derivado de FVIII (resultados expresados en %/ml/24 h)			
Derivado	Ensayo de una etapa	Ensayo de dos etapas	Relación de la actividad de dos etapas/una etapa
dB761	53,2 ± 2,90	85,4 ± 7,85	1,61
dB761-739F	79,5 ± 4,12	251,6 ± 14,57	3,16
dB782	65,0 ± 3,47	70,1 ± 5,79	1,08
dB782-739F	62,6 ± 5,14	98,7 ± 9,15	1,58
FVIII de longitud completa	10,2 ± 1,29	11,3 ± 1,34	1,11

Ejemplo 5 - Establecimiento de líneas celulares HEK293 que expresan derivados de FVIII

Ejemplo 5A - Construcción de plásmidos utilizados para generar células de mamífero que expresan de forma estable derivados de FVIII.

Tal y como se muestra en la Figura 4, el plásmido de expresión de mamífero utilizado en este Ejemplo era pI2G-Hygro que contiene, en el sentido de las agujas del reloj, el promotor de citomegalovirus, un polienlazador y la secuencia de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, seguida por una casete de expresión de resistencia a higromicina dirigida por el promotor de SV40, y un gen que codificaba resistencia a la ampicilina. El polienlazador del plásmido pI2G-Hygro se abrió utilizando KpnI y XhoI. En este vector se ligaron aproximadamente 4,5 kb de fragmentos KpnI y XhoI que contenían las secuencias que codifican los derivados de FVIII que se habían escindido de los plásmidos descritos en los Ejemplos 2, 3 y 4. Cada vector pI2G-Hygro que tiene la secuencia que codifica el derivado del Factor VIII individual se denomina pI2G-Hygro-"nombre del plásmido para cada ADNc de un derivado de FVIII" (véanse los Ejemplos 2, 3 y 4). Por ejemplo, el vector de expresión de mamífero que contiene las secuencias que codifican dB747 y dBN(45-50) (en los Ejemplos 2 y 3) se conocen como pI2G-Hygro-dB47 y PI2G-Hygro-dBN(45-50), respectivamente.

Ejemplo 5B - Transfección estable de células HEK293

Los plásmidos pI2G-hygro que contienen la unidad de transcripción para cada FVIII, fueron linealizados con MfeI y se precipitaron con fenol-cloroformo y etanol como preparación para la transfección de las células HEK293. Las células HEK293 se transfectaron mediante un método de transfección basado en liposomas con ADN linealizado de plásmidos pI2G-Hygro que incluían las secuencias que codificaban los derivados de FVIII. Cada transfección se realizó usando 2 µg de ADN por cada placa de 10 cm de diámetro. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el medio se retiró, las células se trataron con tripsina, se diluyeron y se cultivaron en medio de selección DMEM que contenía higromicina (500 µg/ml) y 10% de suero de ternera fetal. Después de dos semanas, los clones individuales, resistentes al medio selectivo, se aislaron y se expandieron adicionalmente en medio selectivo y después se congelaron para futuros estudios. La secreción de derivados de FVIII se vigiló midiendo la capacidad de los derivados de FVIII para actuar como un cofactor en la conversión dependiente de Factor IXa, del Factor X al Factor Xa, empleando un sustrato cromogénico para el Factor Xa (Coatest Factor VIII, Chromogenix, Suecia).

Ejemplo 5C - Demostración de la expresión de FVIII de cadena sencilla en células HEK293

Con el fin de demostrar que los derivados de FVIII se secretaban en el medio de cultivo como un polipéptido de cadena sencilla, células HEK293 transfectadas de forma estable se cultivaron en medios suplementados con ^{35}S-metionina durante 6 horas. Los medios condicionados y los extractos celulares se prepararon a continuación para el análisis mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (Figura 5A). Se muestra la migración de los derivados de FVIII procedentes de los extractos celulares (C) y del medio condicionado (M). Los nombres de cada uno de los derivados de FVIII se indican en la parte superior. Los resultados muestran que los derivados de FVIII que se habían generado por la fusión de los dominios A1, A2 y B con la secuencia de aminoácidos en el dominio A3, más allá de Arg-1648, un sitio de procesamiento intracelular, no afectaban a la síntesis o la secreción de los derivados de FVIII procedentes de la célula. La especie predominante de FVIII producida era una molécula de cadena sencilla de aproximadamente 170 kDa. Para la inmunotransferencia con el antígeno de FVIII, los medios que contenían los derivados recombinantes del Factor VIII, dB782 y dBN(45-50), así como medios procedentes de células HEK293 normales controles, se concentraron aproximadamente 100 veces usando Centricon 30.000 MWCO el día de la recogida.

La concentración de FVIII se midió usando un método de ELISA. A continuación, se separaron los concentrados mediante SDS-PAGE y se analizaron por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal (ESH-8). Como se muestra en la Figura 5B, el anticuerpo ESH-8 utilizado en la transferencia Western detectaba una proteína principal que migraba a aproximadamente 170 kDa, lo que es similar a los resultados del experimento de marcado metabólico en la Figura 5A.

Estos resultados indican que los derivados de FVIII en esta invención están presentes en los medios de cultivo principalmente en una forma sin procesar, de cadena sencilla de la molécula de FVIII. La Figura 5C representa la activación con trombina de los derivados de FVIII. Derivados de FVIII marcados con ^{35}S-metionina inmunoprecipitaron desde el medio condicionado de rastreo de células HEK293 que se expresaban de forma estable y se dividieron en partes alícuotas iguales y se incubaron en ausencia (pistas 1, 3, 5 y 7) o en presencia (pistas 2, 4, 6 y 8) de trombina (1 U/ml) durante 30 min a 37ºC. Las reacciones terminaron con tampón de muestra de SDS-PAGE y los fragmentos de proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 10%. Las formas proteicas de FVIII se indican a la derecha de la siguiente manera: SC, cadena sencilla; A1 y A2, fragmentos de cadena pesada escindidos con trombina; LC, cadena ligera escindida con trombina. Los nombres de cada uno de los derivados de FVIII se indican en la parte superior. El análisis de la proteína radiomarcada después de la digestión con trombina indicaba una apariencia normal de los fragmentos de 73 kDa, y 50 y 40 kDa, correspondientes a los tamaños moleculares de la cadena ligera escindida con trombina, los dominios A1 y A2, respectivamente. Este resultado mostraba que los derivados de FVIII de cadena sencilla se escinden y después se activan con un patrón similar al de las proteínas de FVIII naturales o de longitud completa. Estos derivados de FVIII de cadena sencilla pueden ser ventajosos porque se pueden producir en formas más homogéneas y pueden tener una estabilidad mejorada frente a otras proteínas de FVIII naturales humanas u otras recombinantes.

Ejemplo 6 - Establecimiento de líneas celulares CHO que expresan derivados de FVIII

Ejemplo 6A - Construcción de plásmidos

Los plásmidos para el establecimiento de líneas celulares CHO transfectadas de forma estable se construyeron mediante la inserción de una casete de expresión denominada pI2G-DHFR que comprendía las secuencias del promotor de SV40, el gen que codificaba el marcador de selección DHFR y las secuencias señal de poliadenilación tardía de SV40, en el único sitio Mfe I de los vectores de expresión de mamífero descritos en el Ejemplo 3. Los extremos liberados por la digestión con Mfe I, se volvieron romos por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El procedimiento de subclonación se describe en la Figura 6.

Ejemplo 6B - Transfección de células CHO con plásmidos

Las células CHO se transfectaron con el ADN linealizado de plásmidos pI2G-DHFR, que incluían secuencias que codificaban dB782, por un método de transfección basado en liposomas, con 1 o 2 µg de ADN por cada placa de 10 cm de diámetro. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se trataron con tripsina, se diluyeron y se incubaron en medio selectivo IMDM incluyendo 10% de suero de ternera fetal dializado sin hipoxantina, timidina y xantina. Después de dos semanas, los clones resistentes al medio selectivo se subcultivaron en copas de 1 ml y luego de 2 ml. Cuando las células alcanzaron 70% de confluencia, el medio se retiró y el césped de células se lavó y se rellenó con medio de nuevo aporte que contenía 5% de suero inactivado (para evitar un ruido de fondo elevado en las pruebas de coagulación). Después de 24 horas, el medio se recogió y se analizó para estudiar la actividad procoagulante de FVIII. El FVIII humano biológicamente activo se cuantificó en muestras de material sobrenadante de un cultivo mediante un ensayo de coagulación convencional (denominado tiempo de tromboplastina parcial activada) utilizando plasma carente de FVIII tal y como se ha descrito previamente (Veldkamp et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 1968, 19: 279). Los resultados de la actividad del Factor VIII en células resistentes a concentraciones crecientes de MTX, se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Comparación de la actividad procoagulante de FVIII (FVIII:C) procedente de células CHO/DBX11 transfectadas con el vector de expresión de mamífero pI2G-dhfr-dB782, que contiene una secuencia codificadora de dB782, antes y después de la amplificación génica con MTX

MTX (µM)	MU/ml/24 horas de FVIII:C
0	< 1,0
0,02	4,94
0,08	16,8
0,3	129
1,0	540
5,0	2900

Ejemplo 7 - Activación de FVIII recombinante de longitud completa y de derivados de FVIII con trombina

FVIII recombinante de longitud completa y los derivados de FVIII se compararon en un estudio de la cinética de la activación con trombina. La activación se midió en una prueba de coagulación clásica (APTT) después de la incubación en presencia de una cantidad catalítica de trombina.

Las Figuras 7A y 7B muestran una comparación de la cinética de activación con trombina, de FVIII recombinante humano (rH FVIII) y de derivados de FVIII. Algunos derivados de FVIII se activan más fuertemente con incrementos de 7 veces después de 5 minutos de incubación con trombina. Dos derivados de FVIII, dBN(64-53) y dBN(64-56), se activan de la misma manera que rh FVIII. Aunque algunos derivados de FVIII tienen mayores aumentos de la activación, no se activan más rápidamente que los otros derivados o que el FVIII de longitud completa, mostrando de ese modo que los derivados de FVIII no están preactivados. Esto es importante para los fines de su uso terapéutico.

Los mayores aumentos de la activación con trombina de algunos derivados se pueden explicar por su menor umbral de activación. Menores cantidades de trombina generadas en un sitio de lesión vascular pueden causar una activación incrementada de los derivados de FVIII, lo que permite que estos derivados actúen como moléculas procoagulantes con un aumento de la eficacia, en comparación con otros derivados con actividad de FVIII. En otras palabras, los derivados de FVIII, excepto dBN(64-53) y dBN(64-56), se pueden activar en un evento muy anterior a los eventos de la coagulación sanguínea. En consecuencia, los derivados de FVIII con un aumento mayor de la activación se pueden administrar a pacientes con hemofilia A, a una dosis mucho más baja y una frecuencia más reducida que otras moléculas con actividad de FVIII. Esto reduce significativamente el riesgo de una producción de anticuerpos inhibidores en los pacientes. Además, esto también reduce aún más los costes de producción y de medicación.

Todas las referencias citadas en esta memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando únicamente una experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención, descritas específicamente en este documento. Se pretende que tales equivalentes estén incluidos en el alcance de las reivindicaciones.

Las realizaciones preferidas de la presente invención son:

Punto 1: Un polipéptido del Factor VIII que comprende una deleción interna de uno o varios aminoácidos entre 1649 y 1688 fusionada con cualquier secuencia de aminoácidos en el dominio B desde aproximadamente 741 a 782, en relación con una secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

Punto 2: El polipéptido del Factor VIII según el punto 1, en el que la deleción interna es de los aminoácidos 746 a 1649, 746 a 1652, 746 a 1655, 758 a 1649, 758 a 1652, 758 a 1655, 765 a 1649, 765 a 1652, 765 a 1655, 748 a 1658, 755 a 1658, 762 a 1658, 769 a 1658, 776 a 1658 o 783 a 1658.

Punto 3: El polipéptido del Factor VIII según el punto 1, que es una cadena sencilla.

Punto 4: El polipéptido del Factor VIII según el punto 1, en el que la prolina en la posición 739 se sustituye por otro aminoácido.

Punto 5: El polipéptido del Factor VIII según el punto 1, que comprende la secuencia de tripéptido (Asn-X-Thr o Asn-X-Ser) que abarca los sitios de fusión entre el aminoácido Asn en las posiciones 745, 757 o 764, y el aminoácido Thr o Ser en las posiciones 1651,1654 o 1657, en relación con una secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

Punto 6: El polipéptido del Factor VIII según el punto 1, representado por la siguiente fórmula con los siguientes dominios dominios enlazados:

H-S-L

en donde

(i) el dominio H representa una secuencia polipeptídica que comprende sustancialmente Ala-1 hasta Arg-740 del Factor VIII humano de acuerdo con SEQ ID NO: 1;

(ii) el dominio S representa un enlazador de tipo espaciador polipeptídico que comprende hasta aproximadamente 60 aminoácidos, en donde el extremo N-terminal del dominio S es aproximadamente el residuo 740, y el extremo C-terminal del dominio S termina aproximadamente en el residuo 1688 del Factor VIII humano de acuerdo con SEQ ID NO: 1; y

(iii) el dominio L representa una secuencia polipeptídica que comprende sustancialmente Arg-1689 hasta Tyr-2332 del Factor VIII humano de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

Punto 7: El polipéptido del Factor VIII según el punto 6, en el que el dominio S comprende una secuencia de

aminoácidos sustancialmente similar a una secuencia consecutiva desde aproximadamente Ser-741 hasta Asn-745, Arg-747, Lys-754, Asn-757, Ile-761, Asn-764, Lys-768, His-775 o Ile-782.

Punto 8: El polipéptido del Factor VIII según el punto 6, en el que el dominio S comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a una secuencia consecutiva desde aproximadamente Glu-1649 hasta Pro-1688.

Punto 9: El polipéptido del Factor VIII según el punto 8, en el que el dominio S comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a una secuencia consecutiva desde aproximadamente Ile-1650, Thr-1653, Gln-1656 o Gln-1659, hasta Pro-1688.

Punto 10: El polipéptido del Factor VIII según el punto 6, en donde en el dominio S, los aminoácidos 746 a 1649, 746 a 1652, 746 a 1655, 758 a 1649, 758 a 1652, 758 a 1655, 765 a 1649, 765 a 1652, 765 a 1655, 748 a 1658, 755 a 1658, 762 a 1658, 769 a 1658, 776 a 1658 o 783 a 1658 se delecionan, en donde los números de los residuos son en referencia a SEQ ID NO: 1.

Punto 11: Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido del Factor VIII del punto 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

Punto 12: Una composición liofilizada que comprende el polipéptido del Factor VIII según el punto 1.

Punto 13: Un método de coagulación de la sangre en un sujeto, que comprende poner en contacto con la sangre una cantidad eficaz para la coagulación, de polipéptido del Factor VIII del punto 1.

Punto 14: Un método de tratamiento de la hemofilia A en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz para la coagulación, del polipéptido del Factor VIII del punto 1 a un paciente que la requiera.

Punto 15: Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido del Factor VIII según el punto 1.

Punto 16: Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según el punto 15, ligado funcionalmente a un promotor.

Punto 17: Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión según el punto 16.

Punto 18: Un método para preparar el polipéptido del Factor VIII según el punto 1, que comprende cultivar la célula según el punto 17 en condiciones adecuadas para que el vector exprese el polipéptido, y aislar el polipéptido.

Punto 19: Un método de coagulación de la sangre en un sujeto que comprende:

a) generar un vector vírico o plasmídico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico según el punto 16;

b) transfectar *in vitro* una población de células cultivadas con dicho vector recombinante, dando como resultado una población de células transfectadas; y

c) administrar las células a un hospedador mamífero, de modo que la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico dentro de dicho hospedador de como resultado la coagulación de la sangre.

Punto 20: Un anticuerpo purificado específico del polipéptido del Factor VIII, según el punto 1.

Listado de Secuencias

<110> SK Chemicals Co., Ltd.

<120> Polipéptidos del Factor VIII

<130> 59258-03USA

<150> US10/353,753

< 151> 2003-01-28

<160> 25

<170> Kopatent In 1.71

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

<400> 1

```
Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1               5                  10                  15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
            20                  25                  30

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 Val His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
    50                  55                  60

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

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
            100                 105                 110

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

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

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

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

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

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

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

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

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

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400

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

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

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

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

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
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

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

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
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

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

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

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 Asn
1010 1015 1020

Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu Phe Lys
1025 1030 1035 1040

Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp Lys Asn Ala
1045 1050 1055

Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys
1060 1065 1070

Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp
1075 1080 1085

Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu
1090 1095 1100

Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser
1105 1110 1115 1120

Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys
1125 1130 1135

Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val
1140 1145 1150

Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe
1155 1160 1165

Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu
1170 1175 1180

Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys
1185 1190 1195 1200

Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr
1205 1210 1215

Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr
1220 1225 1230

Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
1235 1240 1245

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His
1250 1255 1260

Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu
1265 1270 1275 1280

Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg
1285 1290 1295

Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys
1300 1305 1310

Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu
1315 1320 1325

Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met
1330 1335 1340

Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys
1345 1350 1355 1360

Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg
1365 1370 1375

Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys
1380 1385 1390

Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu
1395 1400 1405

Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys
1410 1415 1420

Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys
1425 1430 1435 1440

Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln
1445 1450 1455

Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr
1460 1465 1470

Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
1475 1480 1485

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp
1490 1495 1500

Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu
1505 1510 1515 1520

Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn
1525 1530 1535

Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu
1540 1545 1550

Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp
1555 1560 1565

Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu
1570 1575 1580

Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser
1585 1590 1595 1600

Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly
1605 1610 1615

Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr
1620 1625 1630

Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
1635 1640 1645

Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
1650 1655 1660

Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr
1665 1670 1675 1680

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
1685 1690 1695

His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser
1700 1705 1710

Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
1715 1720 1725

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr
1730 1735 1740

Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly
1745 1750 1755 1760

Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg
1765 1770 1775

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr
1780 1785 1790

Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys
1795 1800 1805

Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala
1810 1815 1820

Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp

1825 1830 1835 1840

Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
1845 1850 1855

Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr
1860 1865 1870

Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser
1875 1880 1885

Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
1890 1895 1900

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala
1905 1910 1915 1920

Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln
1925 1930 1935

Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn
1940 1945 1950

Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu
1970 1975 1980

Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
1985 1990 1995 2000

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val
2005 2010 2015

Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile
2020 2025 2030

Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
2035 2040 2045

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr
2050 2055 2060

Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
2065 2070 2075 2080

Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
2085 2090 2095

Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
2100 2105 2110

Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly
2115 2120 2125

Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
2130 2135 2140

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
2145 2150 2155 2160

Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met
2165 2170 2175

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

Ser 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 Asn
2210 2215 2220

Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
2225 2230 2235 2240

Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr
2245 2250 2255

Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr
2260 2265 2270

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
2275 2280 2285

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg
2290 2295 2300

Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
2305 2310 2315 2320

Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
2325 2330

<210> 2
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador específico de FVIII

<400> 2
agcacaaagg tagaaggcaa gc 22

<210> 3
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador específico de FVIII

<400> 3
cctttgctt ctccagttga ac 22

<210> 4
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador específico de FVIII

<400> 4
ttctctgtga ggtaccagct tc 22

<210> 5
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador específico de FVIII

<400> 5
tgcctgaccc gctattactc ta 22

<210> 6
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador específico de FVIII

<400> 6
tctatctgtg tgagggtgct cg 22

<210> 7
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador específico de FVIII

<400> 7
ggaggaagaa aacttggaag gc 22

<210> 8
< 211> 38
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador de deleción de FVIII

<400> 8
cttctcccag aattcaagac aagaggaaat tgactatg 38

<210> 9
< 211> 37

< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador de deleción de FVIII

<400> 9
cctagcacta ggcaaaagca agaggaaatt gactatg 37

<210> 10
< 211> 40
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador de deleción de FVIII

<400> 10
caatttaatg ccaccacaat tcaagaggaa attgactatg 40

<210> 11
< 211> 39
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador de deleción de FVIII

<400> 11
cagaaaatga catagagaag.caagaggaaa ttgactatg 39

<210> 12
< 211> 37
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador de deleción de FVIII

<400> 12
gaccttggt ttgcacacca agaggaaatt gactatg 37

<210> 13
< 211> 54
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador de deleción de FVIII

<400> 13
gcacacagaa cacctatgcc taaaatacaa gaggaaattg actatgatga tacc 54

<210> 14
< 211> 27
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 14
cgtgatccat gtcgacgcct gcttgcc 27

<210> 15
< 211> 39
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 15
caagaagctt ctcccagaaa ataactcgta ctactcttc 39

<210> 16
< 211> 38
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 16
caagaagctt ctcccagaaa actactcttc agtcagtc 38

<210> 17
< 211> 42
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 17
caagaagctt ctcccagaaa cagtcagatc aagaggaaat tg 42

<210> 18
< 211> 39
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 18
ctagcaaaa gcaatttaat ataactcgta ctactcttc 39

<210> 19
< 211> 38
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 19
ctaggcaaaa gcaatttaat actactcttc agtcagtc 38

<210> 20
< 211> 42

< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 20
ctaggcaaaa gcaatttaat cagtcagatc aagaggaaat tg 42

<210> 21
< 211> 38
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 21
caccacaatt ccagaaaata taactcgtac tactcttc 38

<210> 22
< 211> 37
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 22
caccacaatt ccagaaaata ctactcttca gtcagtc 37

<210> 23
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 23
caccacaatt ccagaaaatc agtcagatca agaggaaatt g 41

<210> 24
< 211> 27
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 24
cgtgatccat gtcgacgcct gcttgcc 27

<210> 25
< 211> 33
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Cebador mutagénico de FVIII

<400> 25
aacaatgcca ttgaattcag aagcttctcc cag 33

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del Factor VIII que comprende una deleción interna de uno o varios aminoácidos comenzando dentro del dominio B y terminando entre Glu-1649 y Pro-1688, en relación con una secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano de longitud completa como se muestra en SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de tripéptido Asn-X-Thr o Asn-X-Ser, generada mediante la unión de una Asn en el dominio B a una Thr o Ser en el dominio A3.

2. El polipéptido del Factor VIII según la reivindicación 1, que es una cadena sencilla.

3. El polipéptido del Factor VIII según la reivindicación 1, en el que el sitio de N-glicosilación artificial se genera uniendo los aminoácidos 746, 758 o 765 a Ser o Thr en las posiciones 1651, 1654 o 1657.

4. El polipéptido del Factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la prolina en la posición 739 se sustituye por otro aminoácido.

5. El polipéptido del Factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la secuencia de tripéptido Asn-X-Thr o Asn-X-Ser que incluye sitios de fusión entre el aminoácido Asn en las posiciones 745, 757 o 764, y el aminoácido Thr o Ser en las posiciones 1651, 1654 o 1657, en relación con una secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

6. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido del Factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Una composición liofilizada que comprende el polipéptido del Factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de la hemofilia A.

9. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido del Factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 9, ligado funcionalmente a un promotor.

11. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 10.

12. Un método de preparación del polipéptido del Factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende cultivar la célula según la reivindicación 11, en condiciones adecuadas para que el vector exprese el polipéptido, y aislar el polipéptido.

FIGURA 1A

1
70
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMG
140
LLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQV
210
LKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHS
280
ETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRN
350
HRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
420
TDSENDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG
490
RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRR
560
LPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD
630
QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVC
700
LHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
770
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD
840
PWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQ
910
LHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP
980
VHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHG
1050
PALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRM
1120
LMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNS
1190
GQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ

FIGURA 1B

1260

EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYEGAYAPVLQDFRSLNDSTNR

1330

TKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKR

1400

IIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIR

1470

PIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSV

1540

TYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANR

1610

PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAI

1680

AAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIY

1750

DEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG

1820

ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQ

1890

HHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY

1960

FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSG

2030

HVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASG

2100

HIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ

2170

FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCD

2240

LNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV

2310

TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP

2332

QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

FIGURA 2

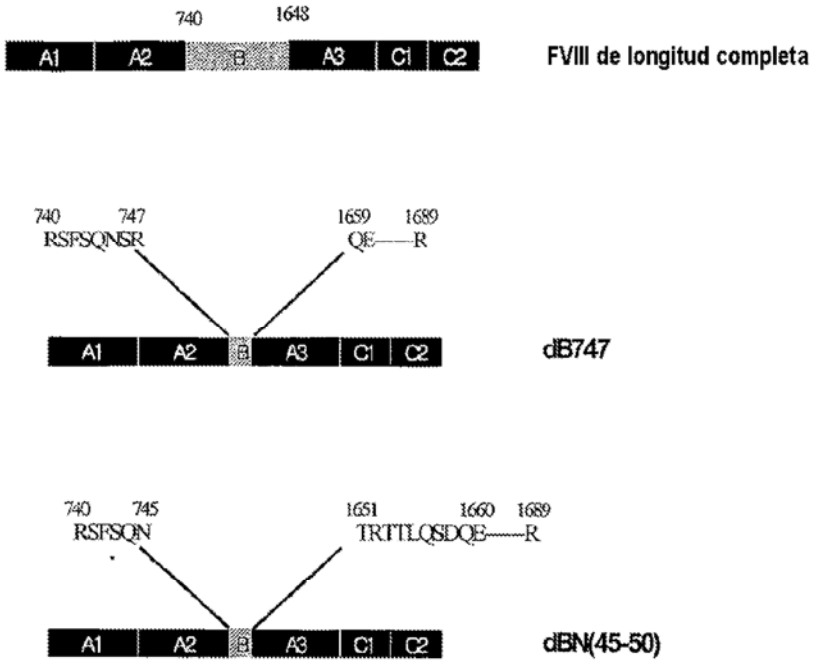
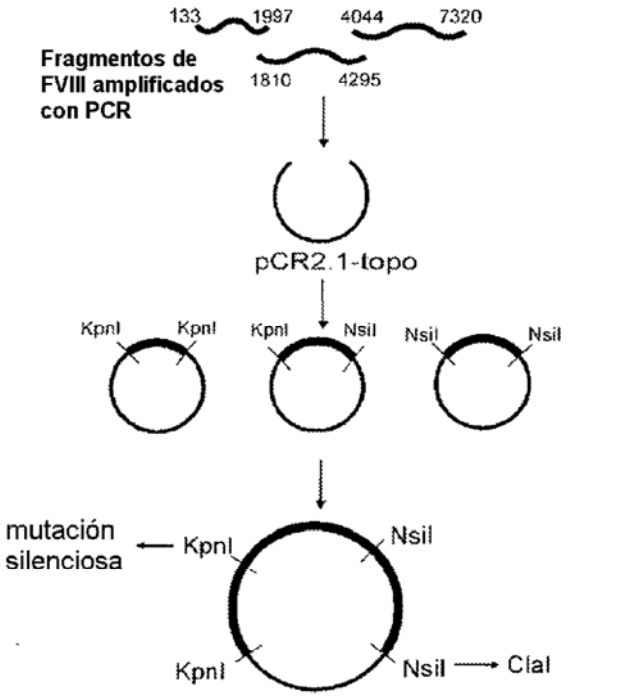

740
1648
A1
A2
B
A3
C1
C2
FVIII de longitud completa
740
747
RSFSQNSR
1659
1689
QE——R
A1
A2
B
A3
C1
C2
dB747
740
745
RSFSQN
1651
1660
1689
TRTTLQSDQE——R
A1
A2
B
A3
C1
C2
dBN(45-50)

FIGURA 3



pCR2.1 FVIII de longitud completa

FIGURA 4

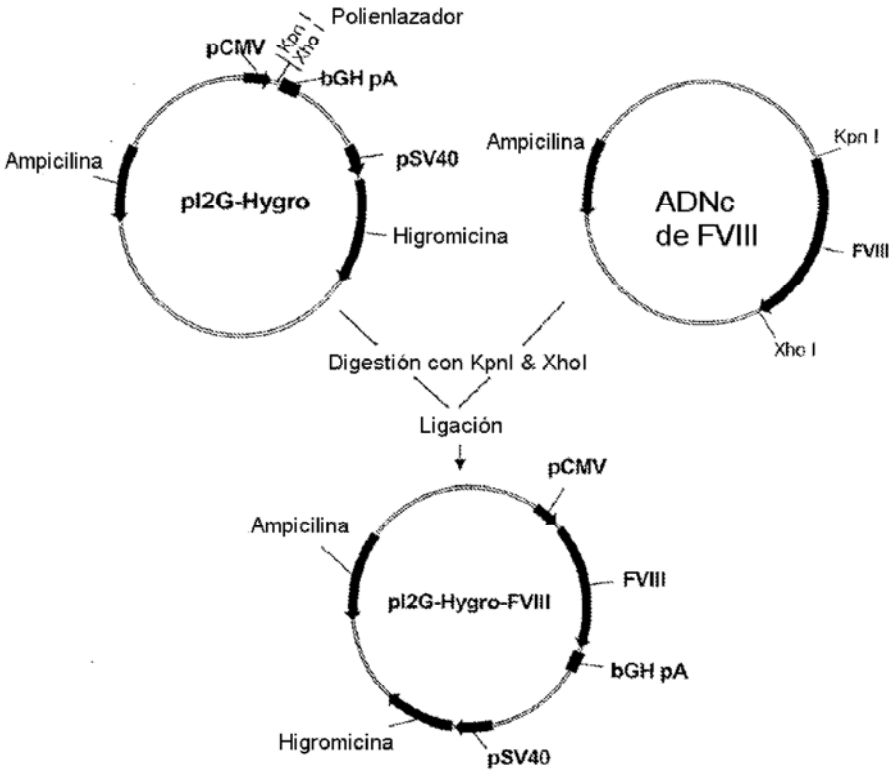

Polienlazador
pCMV
Kpn I
Xho I
bGH pA
Ampicilina
pSV40
pI2G-Hygro
Higromicina
Ampicilina
Kpn I
ADNc
de FVIII
FVIII
Xho I
Digestión con KpnI & XhoI
Ligación
pCMV
Ampicilina
FVIII
pI2G-Hygro-FVIII
bGH pA
Higromicina
pSV40

FIGURA 5A

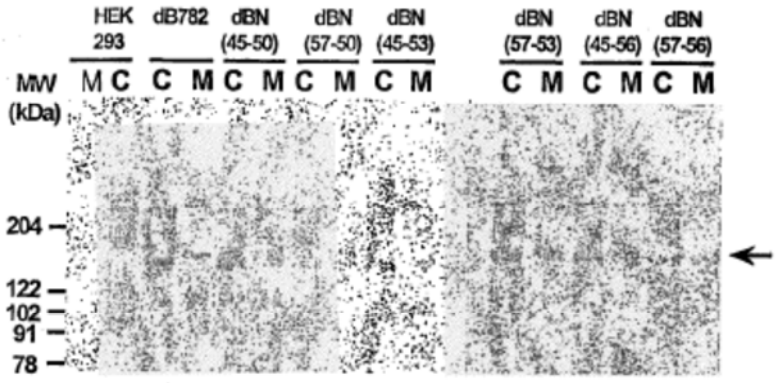


FIGURA 5B

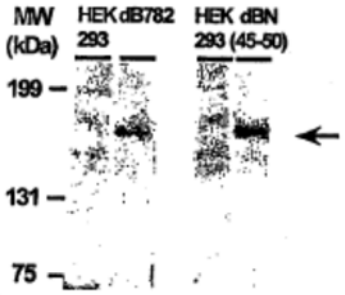


FIGURA 5C

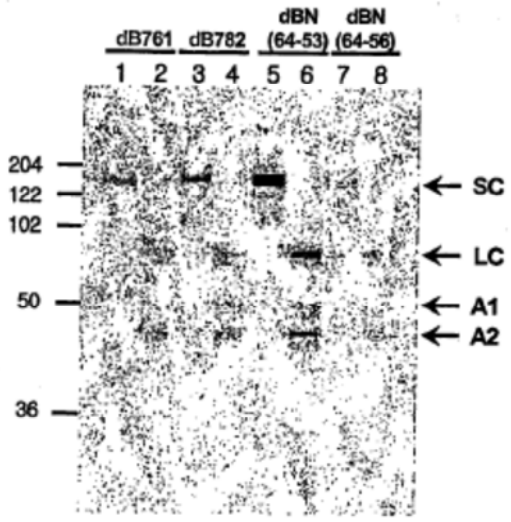

dB761
dB782
dBN (64-53)
dBN (64-56)
1 2 3 4 5 6 7 8
204
122
102
50
36
SC
LC
A1
A2

FIGURA 6

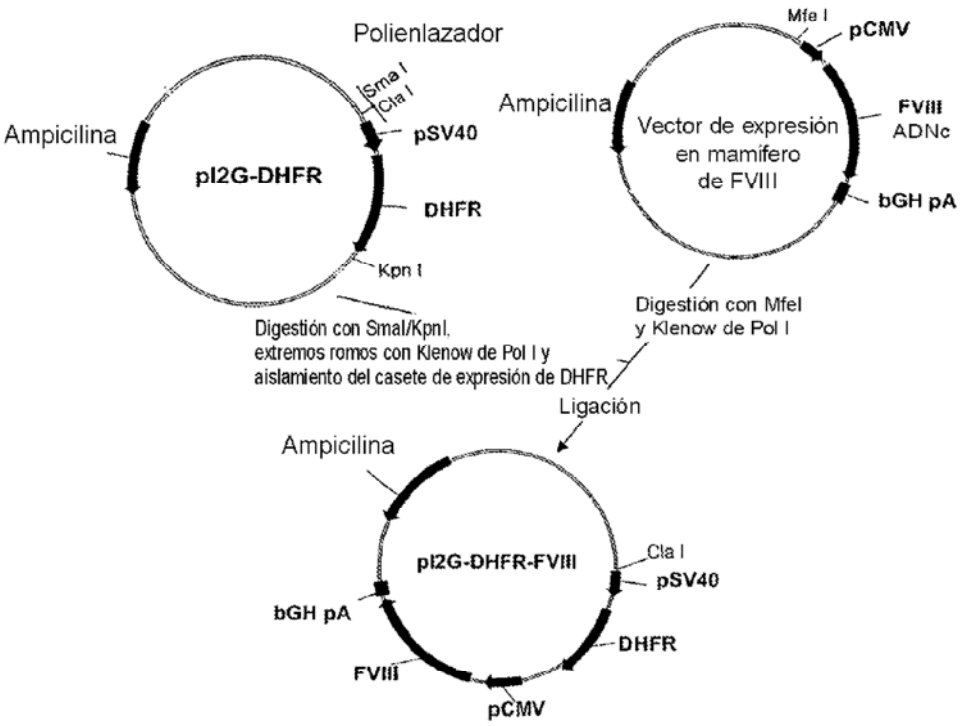

Polienlazador
Sma I
Cla I
Ampicilina
pSV40
pI2G-DHFR
DHFR
Kpn I
Digestión con SmaI/KpnI,
extremos romos con Klenow de Pol I y
aislamiento del casete de expresión de DHFR
Mfe I
pCMV
Ampicilina
Vector de expresión
en mamífero
de FVIII
FVIII
ADNc
bGH pA
Digestión con MfeI
y Klenow de Pol I
Ligación
Ampicilina
pI2G-DHFR-FVIII
Cla I
pSV40
bGH pA
DHFR
FVIII
pCMV

FIGURA 7A

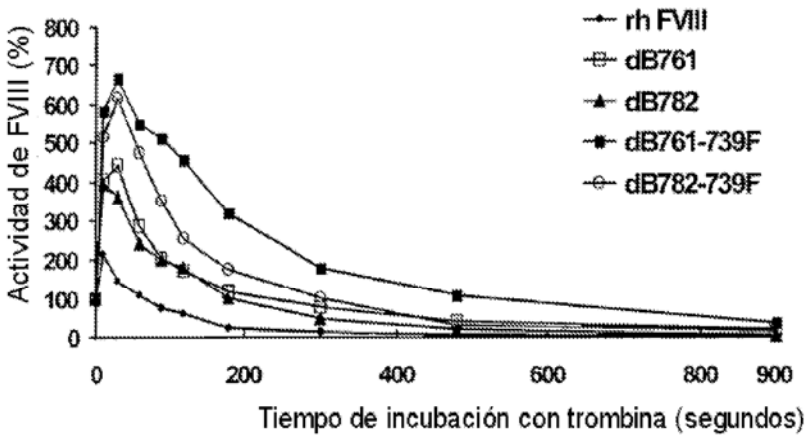
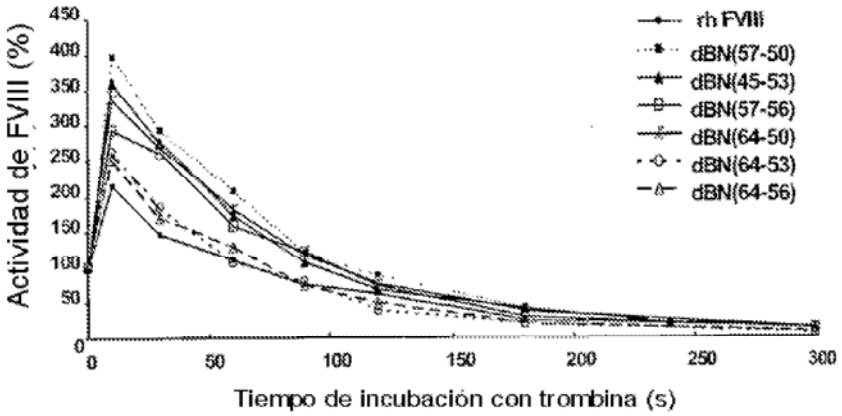

rh FVIII
dB761
dB782
dB761-739F
dB782-739F
Actividad de FVIII (%)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
200
400
600
800
900
Tiempo de incubación con trombina (segundos)

FIGURA 7B


Actividad de FVIII (%)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
300
Tiempo de incubación con trombina (s)
rh FVIII
dBN(57-50)
dBN(45-53)
dBN(57-56)
dBN(64-50)
dBN(64-53)
dBN(64-56)