

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 916**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2005 PCT/US2005/041205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO06053299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005 E 05849392 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1824988**

54 Título: **Modificación de FVIII dirigida al sitio**

30 Prioridad:

12.11.2004 US 627277 P

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

26.09.2017

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard P.O. Box 915
Whippany, NJ 07961, US**

72 Inventor/es:

**PAN, CLARK Q.;
MURPHY, JOHN E.;
MEI, BAISONG;
STRAUSS, JONATHAN S.;
TJANDRA, HENDRI;
CHEN, JIANMIN;
BARNETT, THOMAS;
TANG, LIANG y
WANG, DEQIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 633 916 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modificación de FVIII dirigida al sitio

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a las muteínas del factor VIII (FVIII) que permiten el acoplamiento, en un sitio determinado, a uno o más polímeros biocompatibles tales como el polietilenglicol. Además, se proporcionan formulaciones relacionadas, dosificaciones, y sus usos con fines terapéuticos. Estas variantes de FVIII modificado, y las composiciones y sus usos son útiles para proporcionar una opción de tratamiento con una frecuencia de inyecciones reducida y una respuesta inmunogénica reducida para individuos afectados con hemofilia A.

Antecedentes de la invención

10 La hemofilia A es el trastorno de la coagulación hereditario más común, con una incidencia estimada de 1 por cada 5000 hombres. Está causada por la deficiencia o defectos estructurales del FVIII, un componente crítico de la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea. El tratamiento actual para la hemofilia A implica la inyección intravenosa de FVIII humano. El FVIII humano se ha producido de manera recombinante como una molécula de cadena sencilla de aproximadamente 300 kD. Consiste en los dominios estructurales A1-A2-B-A3-C1-C2 (Thompson, 2003, Semin. Hematol. 29, pp. 11-22). El producto precursor se procesa en dos cadenas polipeptídicas de 200 kD (pesada) y de 80 kD (ligera) en el aparato de Golgi, manteniendo unidas las dos cadenas por iones metálicos (Kaufman y col., 1988, J. Biol. Chem. 263, p. 6352; Andersson y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, p. 2979).

20 Parece que el dominio B del FVIII es prescindible ya que se ha demostrado que el FVIII con el dominio B eliminado (BDD, cadena pesada A1-A2 de 90 kD más la cadena ligera de 80 kD) es eficaz como terapia de remplazo para la hemofilia A. La secuencia del dominio de FVIII que se elimina contiene una eliminación de todos excepto los 14 aminoácidos del dominio B.

25 Los pacientes de hemofilia A se tratan actualmente con la administración intravenosa de FVIII según lo necesiten o como terapia profiláctica administrada varias veces a la semana. Para el tratamiento profiláctico se administra factor VIII a 15-25 UI/kg de peso corporal tres veces a la semana. Esto es necesario constantemente para el paciente. Debido a su corta semivida en el hombre, el FVIII se tiene que administrar frecuentemente. A pesar de su gran tamaño de más de 300 kD para la proteína de longitud completa, el FVIII tiene una semivida en los seres humanos de solo 11 horas (Ewenstein y col, 2004, Semin. Hematol. 41, pp. 1-16). La necesidad de inyecciones intravenosas frecuentes crea tremendas barreras a la conformidad del paciente. Sería más conveniente para los pacientes que se pudiera desarrollar un producto de FVIII que tuviera una semivida más larga y que por lo tanto necesitara una administración menos frecuente. Además, el coste del tratamiento se podría reducir si se aumenta la semivida debido a que se necesitarían menos dosificaciones.

35 Una desventaja adicional de la terapia actual es que aproximadamente el 25-30 % de los pacientes desarrollan anticuerpos que inhiben la actividad del FVIII (Saenko y col, 2002, Haemophilia 8, pp. 1-11). Los epítomos principales de los anticuerpos inhibidores se localizan en el dominio A2 en los restos 484-508, el dominio A3 en los restos 1811-1818, y el dominio C2. El desarrollo de anticuerpos evita el uso de FVIII como terapia de remplazo, forzando a este grupo de pacientes a buscar un tratamiento incluso más caro con una alta dosis de Factor VIIa recombinante y terapia de inmunotolerancia.

40 Los siguientes estudios identificaron los epítomos de FVIII de los anticuerpos inhibidores. En un estudio de 25 muestras de plasma inhibitoras, se descubrió que 11 se unían al fragmento A3C1 C2 de cadena ligera a 73 kD generado de trombina, 4 al dominio A2, y 10 a ambos (Fulcher, C. y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 2(22), pp. 7728-32). En otro estudio, seis de 8 inhibidores del dominio A2 de los pacientes se neutralizaron con un polipéptido A2 recombinante (Scandella, D. y col., 1993, Blood 82(6), pp. 1767-75). Los epítomos de seis de nueve inhibidores de los pacientes se mapearon en los restos 379-538 de A2 (Scandella, D. y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85(16), pp. 6152-6). Se localizó un epítomo de 18 cadenas pesadas inhibitoras para la misma región del extremo N de 18,3 kD del dominio A2 (Scandella, D. y col., 1989, Blood 74(5), pp. 1618-26).

50 Una molécula de FVIII activa recombinante híbrida humana/porcina, generada remplazando los restos del dominio A2 humano 387-604 con la secuencia porcina homóloga, era resistente a un inhibidor A2 del paciente (Lubin, I. y col., 1994, J. Biol. Chem. 269(12), pp. 8639-41) y resistente a un anticuerpo monoclonal murino mAb 413 IgG que compete con los inhibidores A2 del paciente por la unión con A2 (Scandella, D. y col., 1992, Thromb Haemost. 67(6), pp. 665-71). Este epítomo de dominio A1 se localizó adicionalmente en los restos 484-508 del dominio A2 cuando los experimentos demostraron que el mAb 413 IgG y cuatro inhibidores de paciente no inhibían un FVIII híbrido humano/porcino en el que los restos 484-508 del dominio A2 se remplazaban con los porcinos (Healey, J. y col., 1995, J. Biol. Chem. 270(24), pp. 14505-9). Este FVIII híbrido también era más resistente para al menos la mitad de los 23 pacientes explorados (Barrow, R. y col., 2000, Blood 95(2), pp. 564-8). La mutagénesis por exploración de alanina identificó que el resto 487 era crítico para la unión con los cinco inhibidores de paciente ensayados, mientras que los restos 484, 487, 489 y 492 eran importantes para la interacción con el mAb 413 IgG (Lubin, I., J. Biol. Chem. 272(48), pp. 30191-5). Los títulos de anticuerpos inhibidores en ratones que recibían el mutante R484A/R489A/P492A, pero no el mutante R484A/R489A, eran significativamente menores que en los ratones que

recibían el FVIII BDD humano de control (Parker, E. y col., 2004, *Blood* 104(3), pp. 704-10). En suma, la región 484-508 del dominio A2 parece que es un sitio de unión para los inhibidores de la actividad del FVIII.

Además del desarrollo de una respuesta inmunitaria contra FVIII, otro problema con la terapia convencional es que necesita una dosificación frecuente debido a la corta semivida del FVIII in vivo. Se han estudiado los mecanismos de aclaramiento de FVIII de la circulación.

El aclaramiento de FVIII de la circulación se ha atribuido en parte a la unión específica a la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad (LRP), un receptor de aclaramiento hepático con una amplia especificidad de ligando (Oldenburg y col., 2004, *Haemophilia* 10 Supl. 4, pp. 133-139). Recientemente, el receptor lipoproteico de baja densidad (LDL) también demostró que tenía un papel en el aclaramiento del FVIII, tal como cooperando con el LRP en la regulación de los niveles plasmáticos del FVIII (Bovenschen y col., 2005, *Blood* 106, pp. 906-910). Ambas interacciones están facilitadas por la unión a los proteoglicanos de sulfato de heparina de la superficie celular (HSPG). La semivida en el plasma en ratones puede prolongarse 3,3 veces cuando se bloquea la LRP o de 5,5 veces cuando se bloquean tanto la LRP como los HSPG de la superficie celular (Sarafanov y col., 2001, *J. Biol. Chem.* 276, pp. 11970-11979). Se ha hecho la hipótesis de que HSPG concentran el FVIII en la superficie celular y lo presentan a la LRP. Los sitios de unión de LRP a FVIII se han localizado en los restos de A2 484-509 (Saenko y col., 1999, *J. Biol. Chem.* 274, pp. 37685-37692), los restos 1811-1818 de A3 (Bovenschen y col., 2003, *J. Biol. Chem.* 278, pp. 9370-9377) y un epítipo en el dominio C2 (Lenting y col., 1999, *J. Biol. Chem.* 274, pp. 23734-23739).

El FVIII también se aclaraba de la circulación por la acción de las proteasas. Para entender este efecto, se tiene que entender el mecanismo por el que el FVIII está implicado en la coagulación sanguínea. El FVIII circula como un heterodímero de cadenas pesadas y ligeras, unido al vWF. En la unión con el vWF están implicados los restos 1649-1689 de FVIII (Foster y col., 1988, *J. Biol. Chem.* 263, pp. 5230-5234), y partes de los dominios C1 (Jacquemin y col., 2000, *Blood* 96, pp. 958-965) y C2 (Spiegel, P. y col., 2004, *J. Biol. Chem.* 279(51), pp. 53691-8). El FVIII se activa por trombina, que escinde los enlaces peptídico después de los restos 372, 740 y 1689 para generar un heterotrímero de los dominios A1, A2, y A3-C1-C2 (Pittman y col., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 276, pp. 12434-12439). Al activarse, el FVIII se disocia del vWF y se concentra en la superficie celular de plaquetas uniéndose a los fosfolípidos. La unión a los fosfolípidos implica los restos 2199, 2200, 2251, y 2252 de FVIII (Gilbert y col., 2002, *J. Biol. Chem.* 277, pp. 6374-6381). Ahí se une al FIX mediante interacciones con los restos 558-565 (Fay y col., 1994, *J. Biol. Chem.* 269, pp. 20522-20527) y 1811-1818 de FVIII (Lenting y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271, pp. 1935-1940) y FX mediante las interacciones con los restos 349-372 de FVIII (Nogami y col., 2004, *J. Biol. Chem.* 279, pp. 15763-15771) y actúa como cofactor para la activación de FX por FIX, un componente esencial de la ruta de coagulación intrínseca. El FVIII activado (FVIIIa) está parcialmente inactivado por la proteína C activada por proteasas (APC) mediante la escisión después de los restos 336 y 562 de FVIII (Regan y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271, pp. 3982-3987). El determinante predominante de inactivación, sin embargo, es la disociación del dominio A2 del A1 y A3-C1-C2 (Fay y col., 1991, *J. Biol. Chem.* 266, pp. 8957-8962).

Un procedimiento que ha demostrado aumentar la semivida in vivo de una proteína es la PEGilación. La PEGilación es la unión covalente de moléculas de polietilenglicol (PEG) de cadena larga a una proteína u otra molécula. El PEG puede estar en forma lineal o en forma ramificada para producir moléculas diferentes con características diferentes. Además de para aumentar la semivida de péptidos o proteínas, la PEGilación se ha utilizado para reducir la producción de anticuerpos, proteger la proteína de la digestión por proteasas y mantener el material aparte del filtrado renal (Harris y col., 2001, *Clinical Pharmacokinetics* 40, pp. 539-51). Además, la PEGilación puede aumentar también la estabilidad general y la solubilidad de la proteína. Finalmente, la concentración sostenida de proteínas PEGiladas puede reducir la extensión de efectos secundarios adversos reduciendo los niveles de depresión a pico de un fármaco, eliminando de esta manera la necesidad de introducir niveles súper-fisiológicos de proteína en puntos de tiempo tempranos.

Se ha intentado la modificación aleatoria de FVIII dirigiéndose a aminos primarias (extremo N y lisinas) con grandes polímeros tales como el PEG y dextrano con distintos grados de éxito (documento WO94/15625, Patente de EE. UU. 4970300, Patente de EE. UU. 6048720). La mejoría más impresionante, publicada en una solicitud de patente de 1994 (documento WO94/15625), muestra una mejoría de la vida media de 4 veces pero con un coste de pérdida de actividad de 2 veces tras hacer reaccionar el FVIII de longitud completa con un exceso molar de 50 veces de PEG. El documento WO2004/075923 desvela conjugados de FVIII y polietilenglicol que se habían creado por modificación aleatoria. Las proteínas PEGiladas aleatorias, tales como el interferón alfa (Kozlowski y col., 2001, *BioDrugs* 15, pp. 419-429) se han aprobado en el pasado como agentes terapéuticos.

Esta estrategia aleatoria, sin embargo, es mucho más problemática para el FVIII heterodimérico. El FVIII tiene cientos de sitios potenciales para la PEGilación, incluyendo 158 lisinas, los dos extremos N, y múltiples histidinas, serinas, treoninas, y tirosinas, los cuales podrían PEGilarse potencialmente con reactivos que se dirigen primeramente a las aminos primarias. Por ejemplo, se demostró que el isómero posicional principal para el interferón alfa-2b PEGilado era una histidina (Wang y col., 2000, *Biochemistry* 39, pp. 10634-10640). Además, el procesamiento heterogéneo del FVIII de longitud completa puede dar lugar a una mezcla de material de partida que da lugar a una complejidad adicional en los productos PEGilados. Un inconveniente adicional de no controlar el sitio de PEGilación en FVIII es la reducción potencial de la actividad si el PEG se uniera en o cerca de sitios activos

críticos, especialmente si más de un PEG o un PEG único grande se conjugan con el FVIII. Debido a que la PEGilación aleatoria invariablemente producirá grandes cantidades de múltiples productos PEGilados, la purificación para obtener solo productos mono-PEGilados disminuirá drásticamente el rendimiento total. Finalmente, la enorme heterogeneidad en el perfil del producto hará que la síntesis y caracterización de cada lote sea prácticamente imposible. Como la buena fabricación requiere un producto consistente, bien caracterizado, la heterogeneidad del producto es una barrera para la comercialización. Por todas estas razones, se desea un procedimiento más específico para PEGilar FVIII.

Se han resumido distintas estrategias de PEGilación dirigida al sitio en una reciente revisión (Kochendoerfer, G., Curr. Opin. Chem. Biol. 2005, disponible en internet como del 15 de octubre de 2005, identificador de objeto directo:10.1016/j.cbpa.2005.10.007). Una estrategia implica la incorporación de un aminoácido innatural en proteínas por síntesis química o expresión recombinante seguido por la adición de un derivado de PEG que reaccionará específicamente con el aminoácido innatural. Por ejemplo, el aminoácido innatural puede ser uno que contenga un grupo ceto que no se encuentra en proteínas nativas. Sin embargo, la síntesis química de proteínas no es factible para una proteína tan grande como el FVIII. El límite actual de la síntesis peptídica es aproximadamente 50 restos. Se pueden ligar varios péptidos para formar una pieza más grande de polipéptido, pero incluso para producir el FVIII con el dominio B eliminado se necesitaría ligar más de 20 veces, lo que resultaría en menos de un 1 % de recuperación incluso en condiciones de reacción ideales. La expresión de proteínas con aminoácidos innaturales se ha limitado principalmente a sistemas de expresión no mamíferos. Se espera que esta estrategia sea problemática para una proteína grande y compleja tal como el FVIII que necesita expresarse en sistemas de mamífero.

Otra estrategia para la PEGilación específica del sitio de proteínas es dirigiéndose a la amina de la matriz en el extremo N con PEG-aldehídos. El bajo pH que se necesita en este procedimiento para conseguir la especificidad sobre otros grupos amina, sin embargo, no es compatible con el estrecho margen cercano al pH neutro necesario para la estabilidad del FVIII (Wang y col., 2003, International J. Pharmaceutics 259, pp. 1-15). Además, la PEGilación del extremo N de FVIII puede no dar lugar a un aumento de la semivida si esta región no está implicada en el aclaramiento plasmático. De hecho, la región del extremo N de la cadena ligera de FVIII se ha implicado en la unión al factor de von Willebrand (vWF), una proteína portadora que es crítica para la supervivencia de FVIII en la circulación. Modificando el extremo N del factor VIII, se puede destruir o debilitar la asociación críticamente importante con el vWF. Por lo tanto, la PEGilación del extremo N de FVIII puede tener el efecto contrario a la reducción de la semivida plasmática del FVIII.

El documento WO90/12874 desvela la modificación específica del sitio de los polipéptidos IL-3 humana, factor estimulante de colonias de granulocitos y eritropoyetina insertando o sustituyendo una cisteína por otro aminoácido, añadiendo después un ligando que tiene un grupo reactivo sulfhidrilo. El ligando se acopla selectivamente a los restos de cisteína. La modificación de FVIII o cualquier variante del mismo no se desvela.

Por las razones establecidas anteriormente, existe la necesidad de una variante de FVIII mejorada que posea una mayor duración de acción in vivo e inmunogenicidad reducida, que retenga la actividad funcional. Además, es deseable que dicha proteína se produzca como un producto homogéneo de manera constante.

Sumario de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un FVIII polipeptídico funcional conjugado con un polímero biocompatible que tenga características farmacocinéticas y características terapéuticas mejoradas.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un FVIII proteico con el dominio B eliminado conjugado con un polímero biocompatible que tenga propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar un FVIII polipeptídico funcional conjugado con un polímero biocompatible que tenga reducida la unión a la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad (LPR), receptor lipoproteico de baja densidad (LDL), proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) y/o anticuerpos inhibidores contra el FVIII.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar una variante mejorada de FVIII que posea mayor duración de acción in vivo e inmunogenicidad reducida, que es capaz de producirse como un producto homogéneo de manera constante.

La invención se define en las reivindicaciones. En un aspecto de la invención se proporciona un conjugado que tiene la actividad procoagulante del factor VIII que comprende un factor VIII polipeptídico funcional que está mutado de manera que al menos un resto de cisteína se reemplaza con un resto de cisteína de manera que existe un resto de cisteína mutante, en el que el factor VIII polipeptídico funcional está unido covalentemente a un polímero biocompatible en el resto de cisteína mutante, en el que el polímero biocompatible se une covalentemente al polipéptido en uno de los aminoácidos del factor VIII en las posiciones 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1864, 1911, 2091, 2118 y 2284. La invención también incluye un procedimiento para la preparación de este conjugado que comprende la mutación de una secuencia de nucleótidos que codifica en factor VIII polipeptídico funcional para sustituir una secuencia codificante de un resto de cisteína con una secuencia codificante de un resto de cisteína, que expresa la secuencia de

nucleótidos mutada para producir una muteína con cisteína aumentada, purificar la muteína, hacer reaccionar la muteína con el polímero biocompatible, en el que el polímero biocompatible tiene un resto sulfhidrilo reactivo tal como tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo o maleimida que reacciona con el polipéptido en el resto de cisteína introducido para formar el conjugado y purificar el conjugado. La invención se dirige también a las composiciones farmacéuticas que comprenden el conjugado y un adyuvante farmacéuticamente aceptable y el uso de dicho conjugado y dichas composiciones farmacéuticas, respectivamente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia.

Breve descripción de las figuras

- FIG. 1. Mapas de vector y estrategia de mutagénesis para las PEG muteínas.
- FIG. 2. Un perfil de absorbancia UV a 280 nm con respecto al tiempo para la proteína PEG2 purificada sobre una columna de cromatografía de anticuerpo FVIII monoclonal. La cromatografía se llevó a cabo utilizando el sistema de cromatografía AKTA® 100 de Amersham Bioscience.
- FIG. 3. Procedimiento de PEGilación dirigida al sitio en tres etapas. PEG representa un PEG reactivo con cisteína tal como un PEG-maleimida. Las barras cerradas representan la formación de disulfuro mientras que las barras abiertas representan las cisteínas reducidas.
- FIG. 4. PEGilación dirigida al sitio de PEG2.
- FIG. 5. PEGilación dirigida al sitio de PEG6.
- FIG. 6a. PEGilación dirigida al sitio de BDD, PEG2, 4, 5, y 6. Los paneles superiores se tiñeron con un anticuerpo de cadena pesada (H) mientras que los paneles inferiores se tiñeron con un anticuerpo de cadena ligera (L). "U" es el material sin procesar que contiene tanto H como L.
- FIG. 6b. PEGilación de PEG15 y PEG7 con PEG2 y PEG6 como controles. Las PEG muteínas de inicio ("S") se redujeron con TCEP y se PEGilan con un PEG de 12 kD ("12") o 22 kD ("22") tras retirar el reductor ("R"). Las muestras se ejecutaron en SDS-PAGE sobre un 6 % de Tris-glicina y se tiñeron con un anticuerpo de cadena pesada ("HC") en el panel de la izquierda o un anticuerpo de cadena ligera ("LC") en el panel de la derecha. "U" es material sin procesar que contienen tanto HC como LC. Las bandas PEGiladas están resaltadas con puntos.
- FIG. 6c. PEGilación de PEG2+6 con PEG2 y PEG6 como controles. El PEG2, PEG6 o PEG2+6 se reducen con TCEP y se PEGilan con un PEG de 5 kD ("5") o 43 kD ("43") tras retirar el reductor ("R"). El PEG2+6 también se PEGiló con PEG de 12, 22 y 33 kD. Las muestras se ejecutaron en SDS-PAGE sobre un 6 % de Tris-glicina y se tiñó con Coomassie para proteínas en la izquierda o cadena pesada (H) o cadena ligera (L) de anticuerpo. "U" es material sin procesar que contiene tanto H como L. Las bandas PEGiladas están resaltadas con puntos.
- FIG. 6d. PEGilación del FVIII tipo silvestre de longitud completa (KG-2) con PEG2 como control. El gel de la izquierda teñido con tinte Coomassie para proteínas y el gel derecho con yodo para PEG. "BDD U" es material BDD sin procesar que contiene tanto H como L. Las bandas PEGiladas están resaltadas con puntos.
- FIG. 7. Escisión con trombina de PEG2 PEGilado. La mitad del extremo N del dominio A2 se colorea con azul y la mitad del extremo C en verde, con el epítipo para el anticuerpo R8B12 resaltado en verde oscuro (modelo FVIII de la derecha). El PEG2 (calle 1) y el PEG2 PEGilado con 22 kD (calle 2) se trataron con trombina (calles 3 y 4, respectivamente) y después se ejecutaron en gel de Tris-Acetato al 7 % (Invitrogen) y se tiñeron con el anticuerpo R8B212. Cada calle contiene aproximadamente 50 ng de FVIII.
- FIG. 8. Escisión con trombina del FVIII tipo silvestre de longitud completa PEGilado (KG-2). "S" = material KG-2 de partida. "R" = KG-2 reducido y reductor retirado. "P" = "R" PEGilado con PEG de 43 kD. "Puro" = "P" purificado del exceso de PEG. "L" = cadena ligera. Las bandas PEGiladas están resaltadas con puntos.
- FIG. 9. Tinción con yodo de PEG 2 PEGilado. El PEG2 PEGilado con 22 o 43 kD se ejecutó en un gel al 6 % de Tris-glicina y se tiñó con el anticuerpo R8B12 FVIII (calles 1 y 2) o yodo (calles 3 y 4). Las dos tinciones se alinearon de acuerdo con sus calles marcadoras de peso molecular. Las calles 1 y 2 contienen cada una aproximadamente 30 ng de FVIII mientras que las calles 3 y 4 contenían aproximadamente 2 µg.
- FIG. 10. Análisis de espectrometría de masas MALDI de PEG2 PEGilado y no PEGilado. Se llevó a cabo la espectrometría de masas MALDI con PEG2 (Fig. 10a) o PEG2 PEGilado con 22 kD (Fig. 10b). Al PEGilarse, el pico de la cadena pesada (H) del PEG2 está muy reducido y aparece un nuevo pico (H+PEG), centrado en 111 kD (22 kD de PEG + 89 kD de la cadena pesada). No se detectó una cadena ligera (L) PEGilada, que se esperaba centrada en los 100 kD (22 kD de PEG + 83 kD de la cadena ligera).
- FIG. 11. Espectrometría de masas MALDI de PEG2 PEGilado y no PEGilado tras la escisión con trombina.
- FIG. 12. Análisis de espectrometría de masas MALDI de PEG6 PEGilado antes y después de la escisión con trombina.

FIG. 13. El perfil de absorción de UV a 280 nm de PEG2 PEGilado purificado en columna de exclusión por tamaño.

FIG. 14. El perfil de absorción de UV a 280 nm de PEG6 PEGilado y no PEGilado purificados en columna de intercambio catiónico.

5 FIG. 15. El perfil de absorción de UV a 280 nm de PEG6 PEGilado y no PEGilado purificados en columna de exclusión por tamaño.

FIG. 16. Se compara la actividad de la proteína PEGilada con la actividad de la proteína no PEGilada según se mide por un ensayo cromogénico y un ensayo de coagulación. El FVIII de longitud completa purificado se representa como KG-2. El porcentaje de actividad expuesto se determinó dividiendo el valor de la muestra tratada con PEG tras la reducción y retirada del reductor por la de la muestra de control tratada con tampón teniendo en cuenta el rendimiento de la PEGilación.

10

FIG. 17. Estudio PK en conejo de PEG2 PEGilado en comparación con PEG2.

FIG. 18. Estudio PK en conejo de PEG2 PEGilado en comparación con BDD y PEG2. Los valores P son comparaciones entre el PEG2 PEGilado y BDD.

15 FIG. 19. Estudio PK en conejo de PEG6 PEGilado en comparación con BDD y PEG6.

FIG. 20. Estudio PK en conejo del FVIII tipo silvestre de longitud completa ("fl") PEGilado en comparación con el FVIII fl no modificado.

FIG. 21. Estudio PK de ratón hemofílico de PEG6 PEGilado en comparación con PEG6 y BDD.

FIG. 22. Estudio PK en ratón normal de PEG2 PEGilado con 22 kD o 43 kD en comparación con BDD.

20 FIG. 23. Estudio PK en ratón normal de PEG2 PEGilado con 22 kD en comparación con BDD, curso de tiempo completo.

FIG. 24. Histograma de recuperación del Factor VIII (BDD) de ratón hemofílico que representa una evaluación farmacocinética (PK) de la semivida de dos especies de BDD del Factor VIII en un ensayo en ratón hemofílico.

25 FIG. 25. Estudio de laceración renal en ratón hemofílico de PEG2 PEGilado con 22 kD en comparación con BDD. Los ratones tratados con vehículo tienen una pérdida de sangre de 25 ul/gramo de peso corporal.

FIG. 26. Actividad cromogénica de PEG2 PEGilado y BDD en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos para FVIII. El epítipo del anticuerpo se señala entre paréntesis.

FIG. 27. Actividad cromogénica de PEG2 PEGilado en presencia de cantidades crecientes de 413 anticuerpos mAb FVIII.

30 FIG. 28. Actividad cromogénica de BDD, PEG2 PEGilado de 43 kD, PEG6 PEGilado de 33 kD, y PEG2+6 diPEGilado de 33 kD en presencia de plasma humano derivado de pacientes que han desarrollado inhibidores de FVIII. El título de inhibidor y la fecha de recolección de sangre se anotaron arriba. Los dos paneles superiores incluyen los datos recolectados de la dilución de plasma del paciente de 5 a 405 veces. El panel inferior izquierdo se enfoca en la dilución de 1:15 veces para el plasma del paciente HRF-828. El panel inferior derecho confirma que las 0,064 UI/ml que se utiliza para cada muestra de FVIII de los dos paneles superiores no era una dosis saturante.

35

FIG. 29. Procedimiento de exploración de la PEGilación y validación. El panel superior muestra una exploración de la PEGilación esquemática de muteínas PEG expresadas transitoriamente. El panel inferior muestra un análisis de Western de productos PEGilados utilizando un anticuerpo específico de cadena pesada ("H") (izquierda) o un anticuerpo específico de cadena ligera ("L") (derecha). Las bandas PEGiladas se resaltan con puntos. "U" es material sin procesar que contiene tanto H como L.

40

FIG. 30. Exploración de la PEGilación de PEG 15-17. Análisis de Western de productos PEGilados utilizando anticuerpos específicos de cadena pesada ("H") (R8B12 y 58.12) o anticuerpos específicos de cadena ligera ("L") (C7F7 y GM). Las tres muteínas son selectivas de la cadena pesada, con una eficacia de PEGilación relativa de PEG15 ~ PEG16 > PEG17. Las bandas PEGiladas se resaltan con puntos. "U" es material sin procesar que contiene tanto H como L.

45

FIG. 31. Gel que muestra la PEGilación de PEG2+14 en función de concentración de reductor. Se trataron el PEG2+14 se trató con 67 a 670 uM de TCEP durante 30 min a 4 °C. El reductor se retiró en una columna de centrifugación seguido por PEGilación con un PEG de 12 kD. Las cadenas pesada y ligera de FVIII están resaltadas por "H" y "L" respectivamente. Los dos puntos puntualizan las cadenas pesada y ligera PEGiladas.

50

FIG. 32. Espectro de masas desarrollado de PEG2+14 tratado en 67 a 670 uM de TCEP seguido por eliminación del reductor

Descripción detallada de la invención

5 La invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa en el descubrimiento de que los polipéptidos que tienen actividad de FVIII se pueden unir covalentemente a un sitio predefinido de un polímero biocompatible que no sea una amina del extremo N, y de que dichos polipéptidos mantienen sustancialmente su actividad coagulante. Además, estos conjugados polipeptídicos tienen un tiempo de circulación mejorado y antigenicidad reducida. Los conjugados de la invención son ventajosos respecto a los conjugados de la técnica anterior que tenían uniones aleatorias del polímero a FVIII o uniones en el extremo N. La unión dirigida al sitio permite diseñar modificaciones que eviten las regiones necesarias para la actividad biológica y de esta manera mantener sustancialmente la actividad de FVIII. También permite diseñar dónde unir los polímeros para bloquear la unión a sitios implicados en el aclaramiento de FVIII. La unión dirigida al sitio también permite un producto uniforme más que los conjugados heterogéneos producidos en la técnica por acoplamiento aleatorio del polímero. Evitando la unión en la amina del extremo N de la cadena ligera, los conjugados de la presente invención evitan la posible pérdida de actividad por unión del ligando en un sitio activo del FVIII polipeptídico. Se cree que la región del extremo N de la cadena ligera está implicada en la asociación del factor de vWF al FVIII, lo que es una asociación estabilizante en la circulación.

Definiciones

20 Polímero biocompatible. Un polímero biocompatible incluye óxidos de polialquileo tal como sin limitación, polietilenglicol (PEG), dextranos, ácidos colomínicos u otros polímeros basados en carbohidratos, polímeros de aminoácidos, derivados de biotina, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, anhídrido del ácido maleico-co-polietileno, anhídrido del ácido málico-co-poliestireno, polioxazolina, poliacriloilmofolina, heparina, albúmina, celulosas, hidrolizados de quitosano, almidones, tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glicogeno, agarosas y derivados de las mismas, goma guar, pululano, inulina, goma de xantano, carragenano, pectina, hidrolizados de ácido algínico, otros biopolímeros y cualquier equivalente de los mismos. Se prefiere el polietilenglicol, y aún más preferido es el metoxipolietilenglicol (mPEG). Otros compuestos de polialquilenglicol útiles son los polipropilenglicoles (PPG), polibutilenglicoles (PBG), glicidil éteres-PEG (EpoX-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados, polietilenglicoles lineales, polietilenglicoles bifurcados y polietilenglicoles multi-brazo o "súper ramificados" (star-PEG).

30 Polietilenglicol (PEG). "PEG" y "polietilenglicol" como se utilizan en el presente documento son intercambiables e incluyen cualquier poli(óxido de etileno) hidrosoluble. Típicamente, los PEG para su uso de acuerdo con la invención comprenden la siguiente estructura "--(OCH₂CH₂)_n--" donde (n) es de 2 a 4000. Como se utiliza en el presente documento, PEG también incluye "--CH₂CH₂--O(CH₂CH₂O)_n--CH₂CH₂--" y "--(OCH₂CH₂)_nO--", dependiendo de si se han desplazado o no los oxígenos terminales. A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se debería recordar que el término "PEG" incluye estructuras que tienen distintos grupos terminales o "de protección final", tal como sin limitación, un grupo hidroxilo o C₁₋₂₀ alcoxi. El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, mayor del 50 %, de subunidades --OCH₂CH₂--repetidas. Con respecto a las formas específicas, el PEG puede tener cualquiera de una variedad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías, tales como ramificadas, lineales, bifurcadas, y multifuncionales.

40 PEGilación. PEGilación es un procedimiento por el que un polietilenglicol (PEG) se une covalentemente a una molécula tal como una proteína.

Grupo activado o activo funcional. Cuando un grupo funcional tal como un polímero biocompatible se describe como activado, el grupo funcional reacciona fácilmente con un electrófilo o nucleófilo en otra molécula.

45 FVIII con el dominio B eliminado (BDD). Como se utiliza en el presente documento, BDD se caracteriza por tener la secuencia de aminoácidos que contiene una eliminación de casi todos los 14 aminoácidos del dominio B de FVIII. Los primeros 4 aminoácidos del dominio B (SFSQ, SEQ ID NO: 1) están unidos a los 10 últimos restos del dominio B (NPPVLKRHQR, SEQ ID NO: 2). (Lind, P. y col, 1995, Eur. J. Biochem. 232, pp. 19-27). El BDD utilizado en el presente documento tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

50 FVIII. El Factor de coagulación sanguínea VIII (FVIII) es una glucoproteína sintetizada y liberada en la corriente sanguínea por el hígado. En la sangre circulante, se une con el factor de von Willebrand (vWF, también conocido como antígeno relacionado con el Factor VIII). Al activarse por la trombina, se disocia del complejo para interactuar con otros factores de coagulación en la cascada de coagulación, que da lugar eventualmente a la formación de un trombo. El FVIII de longitud completa humano tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, aunque es posible que haya variantes alélicas.

55 Factor VIII polipeptídico funcional. Como se utiliza en el presente documento factor VIII polipeptídico funcional significa un polipéptido o combinación de polipéptidos funcionales que son capaces, in vivo o in vitro, de corregir las deficiencias de factor VIII humano, que caracterizan, por ejemplo, la hemofilia A. El factor VIII tiene múltiples formas de degradación o procesadas en el estado natural. Estos se derivan proteolíticamente de un precursor, una cadena

5 proteica, como se demuestra en el presente documento. Un factor VIII polipeptídico funcional incluye dicha proteína de cadena sencilla y también proporciona estos distintos productos de degradación que tienen actividad biológica corrigiendo las deficiencias de factor VIII humano. Probablemente existen variaciones alélicas. Los factores VIII polipeptídicos funcionales incluyen todas dichas variaciones alélicas, versiones glucosiladas, modificaciones y fragmentos que dan como resultado derivados del factor VIII siempre que contengan el segmento funcional del factor VIII humano y la actividad esencial, característica del factor VIII humano funcional permanezca sin afectar del mismo modo. Estos derivados del factor VIII que poseen el requisito de actividad funcional se pueden identificar fácilmente por ensayos in vitro directos descritos en el presente documento. Además, el factor VIII polipeptídico funcional es capaz de catalizar la conversión del factor X a Xa en presencia del factor IXa, calcio, y fosfolípidos, así como la corrección del defecto de coagulación en el plasma derivado de individuos afectados por hemofilia A. A partir de la divulgación de la secuencia de secuencias de aminoácidos del factor VIII humano y las regiones funcionales en la misma, los fragmentos que se pueden derivar mediante el corte con enzimas de restricción del ADN o proteolítico u otra degradación del factor VIII proteico humano serán evidentes para los expertos en la técnica.

15 FIX. Como se utiliza en el presente documento, FIX significa Factor de Coagulación IX, que también se conoce como factor de formación de trombo IX humano, o componente tromboplastina del plasma.

FX. Como se utiliza en el presente documento, FX significa el Factor de Coagulación X, que también se conoce como factor de formación de trombo X humano y por el epónimo de factor de Stuart-Prower.

20 Farmacocinética. "Farmacocinética" ("PK") es un término que se utiliza para describir las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en el cuerpo. Una mejora de la farmacocinética de un fármaco significa una mejoría en estas características que hacen al fármaco más eficaz in vivo como agente terapéutico, especialmente su duración útil en el cuerpo.

Muteína. Una muteína es una proteína modificada genéticamente que aparece como resultado de una mutación inducida en el laboratorio en una proteína o polipéptido.

Proteína. Como se utiliza en el presente documento proteína y polipéptido son sinónimos.

25 Receptor de aclaramiento del FVIII. Un receptor de aclaramiento del FVIII como se utiliza en el presente documento significa una región del receptor en el FVIII polipeptídico funcional que se une o asocia con una o más moléculas distintas para dar como resultado el aclaramiento de FVIII de la circulación. Los receptores de aclaramiento del FVIII incluyen sin limitación las regiones de la molécula de FVIII que se unen a LRP, receptor LDL y/o HSPG.

Conclusión

30 Se concibe que cualquier factor VIII polipeptídico funcional se pueda mutar en un sitio predeterminado y después unirse covalentemente en ese sitio a un polímero biocompatible de acuerdo con los procedimientos de la invención. Los polipéptidos útiles incluyen, sin limitación, factor VIII de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4 y BDD de FVIII que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Se prefiere el BDD de FVIII.

35 El polímero biocompatible que se utiliza en los conjugados de la invención puede ser cualquiera de los polímeros expuestos anteriormente. El polímero biocompatible se selecciona para proporcionar la mejora deseada en la farmacocinética. Por ejemplo, la identidad, tamaño y estructura del polímero se selecciona de manera que mejore la semivida en la circulación del polipéptido que tiene actividad FVIII o la disminución de antigenicidad del polipéptido sin un descenso inaceptable de la actividad.. Preferentemente, el polímero comprende PEG, y aún más preferentemente tiene al menos el 50 % del peso de PEG. En una realización, el polímero es un polietilenglicol protegido en el extremo con un resto de protección del extremo tal como un hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenoxi, alquenoxi sustituido, alquinox, alquinox sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido. Aún más preferidos son los polímeros que comprenden metoxipolietilenglicol que tiene un intervalo de tamaño desde 3 kD a 100 kD, y más preferentemente desde 5 kD a 64 kD o desde 5 kD a 43 kD.

45 Preferentemente, el polímero tiene un resto reactivo. Por ejemplo, en una realización, el polímero tiene un resto reactivo sulfhidrilo que puede reaccionar con una cisteína libre de un factor VIII polipeptídico funcional para formar una unión covalente. Dichos restos reactivos sulfhidrilo incluyen restos tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo o maleimida. Se prefiere un resto maleimida. En una realización, el polímero es lineal y tiene una "protección" en un extremo que no es fuertemente reactivo con los sulfhidrilos (tal como un metoxi) y un resto reactivo sulfhidrilo en el otro extremo. En una realización preferida, el conjugado comprende un PEG maleimida y tiene un intervalo de tamaño desde 5 kD a 64 kD.

Una guía adicional para seleccionar polímeros biocompatibles útiles se proporciona en los ejemplos siguientes.

55 La mutación dirigida al sitio de una secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido que tiene actividad FVIII puede producirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los procedimientos preferidos incluyen la mutagénesis para introducir un codón de cisteína en el sitio elegido para la unión covalente del polímero. Esto se puede conseguir utilizando un kit de mutagénesis dirigida al sitio tal como el kit de mutagénesis dirigida al sitio

cQuickChange™ de Stratagene, el kit de mutagénesis dirigida al sitio nº K1600-1 Transformer de Clontech, el sistema de mutagénesis dirigida al sitio nº 12397014 GenTaylor de Invitrogen, el kit de sistema de mutagénesis in vitro nº Q6210 Altered Sites II de Promega, o el kit de mutagénesis por PCR nº TAK RR016.

5 Los conjugados de la invención pueden prepararse reemplazando primero el codón de uno o más aminoácidos en la superficie del FVIII polipeptídico funcional con un codón para la cisteína, produciendo la muteína de cisteína en un sistema de expresión recombinante, hacer reaccionar la muteína con un reactivo polimérico específico de cisteína, y purificar la muteína.

10 En este sistema, la adición de un polímero al sitio de cisteína puede conseguirse mediante una funcionalidad activa de maleimida en el polímero. Ejemplos de esta tecnología se proporcionan posteriormente. La cantidad del polímero reactivo con sulfhidrilo que se utiliza debería ser al menos equimolar con la cantidad molar de cisteína que se va a derivar y preferentemente está presente en exceso. Preferentemente, se utiliza al menos un exceso molar de 5 veces de polímero reactivo con sulfhidrilo, y aún más preferentemente se utiliza al menos un exceso de diez veces de dicho polímero. Otras condiciones útiles para la unión covalente están en la experiencia de los expertos en la técnica.

15 En los ejemplos siguientes, las muteínas se nombran de la manera convencional en la técnica. La convención para nombrar los mutantes se basan en la secuencia de aminoácidos del Factor VIII de longitud completa, maduro como se proporciona en SEQ ID NO: 4. Como una proteína secretada, el FVIII contiene una secuencia de señal que está escindida proteolíticamente durante el proceso de traducción. Después de la retirada de la secuencia de señal de 19 aminoácidos, el primer aminoácido del producto FVIII secretado es una alanina.

20 Como es convencional y se utiliza en el presente documento, cuando se hace referencia a aminoácidos mutados en BDD FVIII, el aminoácido mutado se designa por su posición en la secuencia del FVIII de longitud completa. Por ejemplo, la muteína PEG6 expuesta posteriormente se designa K1808C debido a que cambia la lisina (K) en la posición análoga a 1808 en la secuencia de longitud completa por cisteína (C).

25 El sitio predefinido para la unión covalente del polímero mejor que se selecciona de entre los sitios expuestos en la superficie del polipéptido que no están implicados en la actividad FVIII o implicados en otros mecanismos que estabilizan el FVIII in vivo, tal como la unión al vWF. Dichos sitios también son los mejores que se seleccionan de entre los sitios conocidos que están implicados en los mecanismos por los que se desactiva el FVIII o se aclara de la circulación. La selección de estos sitios se expone con detalle posteriormente. Los sitios preferidos incluyen un resto de aminoácido en o cerca del sitio de unión para (a) la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad, (b) un proteoglicano de sulfato de heparina, (c) el receptor lipoproteico de baja densidad y/o (d) anticuerpos inhibidores del factor VIII. "En o cerca de un sitio de unión" significa un resto que está suficientemente cerca de un sitio de unión tal como una unión covalente de un polímero biocompatible al sitio que resultaría en un impedimento estérico del sitio de unión. Se espera que dicho sitio esté a 20 Å del sitio de unión, por ejemplo.

35 En una realización de la invención, el polímero biocompatible se une covalentemente al factor VIII polipeptídico funcional en un resto de aminoácido en o cerca de (a) un receptor de aclaramiento del factor VIII como se ha definido anteriormente, (b) un sitio de unión para una proteasa capaz de la degradación del factor VIII y/o (c) un sitio de unión para anticuerpos inhibidores del factor VIII. La proteasa puede ser la proteína C activada (APC). En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente al sitio predefinido del factor VIII polipeptídico funcional de manera que la unión de la proteína relacionada al receptor lipoproteico de baja densidad es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, y preferentemente más de dos veces menor. En una realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido en el factor VIII polipeptídico funcional de manera que la unión de proteoglicanos de sulfato de heparina al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, y preferentemente es más de dos veces menor. En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al sitio predefinido en el factor VIII polipeptídico funcional de manera que la unión de anticuerpos inhibidores del factor VIII al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, preferentemente más de dos veces menor que la unión al polipéptido cuando no está conjugado. En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido del factor VIII polipeptídico funcional de manera que la unión al receptor lipoproteico de baja densidad al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, preferentemente más de dos veces menor. En otra realización el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido del factor VIII polipeptídico funcional de manera que una proteasa plasmática degrade el polipéptido menor que cuando el polipéptido no está conjugado. En una realización adicional, la degradación del polipéptido por la proteasa plasmática es más de dos veces menor que la degradación del polipéptido cuando no está conjugado según se mide en las mismas condiciones durante el mismo periodo de tiempo.

55 La afinidad de unión de LRP, receptor LDL, o HSPG por el FVIII puede determinarse utilizando una tecnología de resonancia de plasmones superficiales (Biacore). Por ejemplo, el FVIII se puede revestir directa o indirectamente por medio de un anticuerpo de FVIII contra un chip Biacore™, y se pueden pasar concentraciones variables de LRP sobre el chip para medir tanto la tasa de asociación como de disociación de la interacción (Bovenschen N. y col., 2003, J. Biol. Chem. 278(11), pp. 9370-7). la relación de las dos tasas da una medida de la afinidad. Sería deseable una disminución de la afinidad de dos veces, preferentemente cinco veces, más preferentemente diez veces, e

incluso más preferentemente de 30 veces con la PEGilación.

La degradación de un FVIII por la proteasa APC se puede medir por cualquiera de los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

5 En una realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en uno o más de los aminoácidos del factor VIII en las posiciones 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284. En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en uno o más de los aminoácidos del factor VIII en las posiciones 377, 378, 468, 491, 504, 556, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911 y 2284 y (1) la unión del conjugado de la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad es menor que la unión del polipéptido no conjugado a la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad; (2) la unión del conjugado al receptor lipoproteico de baja densidad es menor que la unión del polipéptido no conjugado al receptor lipoproteico de baja densidad; o (3) la unión del conjugado a la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad y el receptor lipoproteico de baja densidad es menor que la unión del polipéptido no conjugado a la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad y el receptor lipoproteico de baja densidad.

15 En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en uno o más de los aminoácidos del factor VIII en las posiciones 377, 378, 468, 491, 504, 556 y 711 y la unión del conjugado al proteoglicano de sulfato de heparina es menor que la unión del polipéptido no conjugado al proteoglicano de sulfato de heparina. En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más posiciones de aminoácidos del factor VIII 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284 y el conjugado tiene menos unión a los anticuerpos inhibidores del factor VIII que el polipéptido no conjugado. En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más posiciones de aminoácidos del factor VIII 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284, y preferentemente en una o más de las posiciones 377, 378, 468, 491, 504, 556, y 711 y el conjugado tiene menos degradación por la proteasa plasmática capaz de la degradación del factor VIII que el polipéptido no conjugado. Más preferentemente, la proteasa plasmática es la proteína C activada.

20 En una realización adicional, el polímero biocompatible es unido covalentemente al factor VIII con el dominio B eliminado en la posición de aminoácido 129, 491, 1804, y/o 1808, más preferentemente 491 o 1808. En una realización adicional, el polímero biocompatible se une al polipéptido en la posición de aminoácidos del factor VIII 1804 y comprende polietilenglicol. Preferentemente, el uno o más sitios predefinidos para la unión del polímero biocompatible se controlan por mutación específica del sitio de cisteína.

25 Uno o más sitios, preferentemente uno o dos, en el factor VIII polipeptídico funcional pueden ser los sitios predefinidos para la unión del polímero. En realizaciones particulares, el polipéptido es mono-PEGilado o di-PEGilado.

35 La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación del conjugado que comprende la mutación de una secuencia de nucleótidos que codifica el factor VIII polipeptídico funcional para sustituir una secuencia codificante de un resto no cisteína con una secuencia codificante de un resto de cisteína, que exprese la secuencia de nucleótidos mutada para producir una muteína con cisteína aumentada, purificar la muteína, hacer reaccionar la muteína con un polímero biocompatible, en el que el polímero biocompatible tiene un resto reactivo sulfhidrilo tal como un tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo o maleimida que reacciona con el polipéptido en el resto de cisteína introducido para formar el conjugado y purificar el conjugado.

40 La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para la administración parenteral que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de los conjugados de la invención, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptables son sustancias que se pueden añadir al ingrediente activo para formular o estabilizar la preparación y que no produzcan efectos toxicológicos adversos significativos al paciente. Los ejemplos de dichos adyuvantes son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, agua, azúcares tales como maltosa o sacarosa, albúmina, sales, etc. Otros adyuvantes se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz del conjugado junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de preparar composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración eficaz al huésped. Por ejemplo, el conjugado se puede administrar por vía parenteral a los sujetos que padecen hemofilia A con una dosificación que puede variar con la gravedad del episodio hemorrágico. Las dosis medias administradas por vía intravenosa están en el intervalo de 40 unidades por kilogramo para indicaciones pre-operatorias, 15 a 20 unidades por kilogramo para una hemorragia menor, y de 20 a 40 unidades por kilogramo administradas durante un periodo de 8 horas para una dosis de mantenimiento.

55 En una realización relacionada del procedimiento de la invención implica la sustitución de uno o más aminoácidos del BDD de superficie, producir la muteína de cisteína en un sistema de expresión de mamífero, reducir una cisteína que se haya protegido durante la expresión por cisteína del medio de cultivo, eliminar el reductor para permitir que se vuelvan a formar los disulfuros del BDD, y hacerlo reaccionar con un reactivo de polímero biocompatible específico de cisteína, tal como PEG-maleimida. Ejemplos de dichos reactivos son PEG-maleimida con tamaños del

PEG tales como 5, 22, o 43 kD disponibles en Nektar Therapeutics of San Carlos, CA con los número de catálogo de Nektar 2D2M0H01 mPEG-MAL MW 5,000 Da, 2D2M0P01 mPEG-MAL PM 20 kD, 2D3X0P01 mPEG2-MAL PM 40 kD, respectivamente, o 12 o 33 kD disponibles en NOF Corporation, Tokyo, Japón con el número de catálogo NOF Sunbright ME-120MA y Sunbright ME-300MA, respectivamente. El producto PEGilado se purifica utilizando una cromatografía de intercambio iónico para retirar el PEG que no ha reaccionado y utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño para retirar el BDD que no ha reaccionado. Este procedimiento puede utilizarse para identificar y proteger selectivamente cualquier interacción no favorable con el FVIII tal como el aclaramiento mediado por receptor, la unión a anticuerpos inhibidores, y la degradación por enzimas proteolíticas. Los inventores notaron que el reactivo de PEG suministrado por Nektar o NOF como de 5 kD se ensayó y era de 6 kD en su laboratorio, y de manera similar, el reactivo de PEG suministrado como de 20 kD lineal se ensayó y era de 22 kD, el que se suministró como de 40 kD se ensayó y era de 43 kD y el que suministró como de 60 kD se ensayó y era de 64 kD en su laboratorio. Para evitar confusiones, los inventores utilizaron el peso molecular como se ensayó en su laboratorio en la exposición del presente documento, excepto para el PEG de 5 kD, que se expuso como de 5 kD como lo identificó el fabricante.

Además de las mutaciones en cisteína en las posiciones 491 y 1808 de BDD (desvelado anteriormente), se mutaron en cisteína las posiciones 487, 496, 504, 468, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803, y 1804 para permitir potencialmente el bloqueo de la unión a LRP con la PEGilación. También se mutaron en cisteína las posiciones 377, 378, y 556 para permitir el bloqueo de la unión a LRP y HSPG con la PEGilación. Las posiciones 81, 129, 422, 523, 570, 1864, 1911, 2091, y 2284 se seleccionaron al estar espaciadas igualmente en el BDD de manera que la PEGilación dirigida al sitio con PEG grandes (> 40 kD) en estas posiciones junto con la PEGilación en los sitios de glicosilación nativos (41, 239, y 2118) y sitios de unión a LRP debería cubrir completamente la superficie de BDD e identificar un nuevo mecanismo de aclaramiento para BDD.

Ejemplos

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD DE FVIII. El FVIII y BDD son moléculas complejas muy grandes con muchos sitios diferentes implicados en reacciones biológicas. Los intentos anteriores para modificarlos para mejorar las propiedades farmacocinéticas tuvieron resultados mixtos. El que las moléculas se pudieran mutar específicamente y luego añadirse un polímero de una manera específica del sitio era sorprendente. Además, los resultados de mejora de las propiedades farmacocinéticas y mantenimiento de la actividad también eran sorprendentes, dados los problemas de los conjugados poliméricos anteriores que causaban adición no específica y actividad reducida.

En una realización, la invención se refiere a la mutagénesis dirigida al sitio utilizando ligandos específicos de cisteína tal como el PEG-maleimida. Un BDD no mutado no tiene cisteínas disponibles para reaccionar con un PEG-maleimida, por lo que solo la posición mutada en cisteína será el sitio de la PEGilación. Más específicamente el BDD de FVIII tiene 19 cisteínas, 16 de las cuales forman disulfuros y las otras tres son cisteínas libres (McMullen y col., 1995, Protein Sci. 4, pp. 740-746). El modelo estructural de BDD sugiere que las 3 cisteínas libres están ocultas (Stoliova-McPhie y col., 2002, Blood 99, pp. 1215-1223). Debido a que las cisteínas oxidadas no pueden PEGilarse por los PEG-maleimidados, las 16 cisteínas que forman disulfuros en BDD no pueden PEGilarse sin reducirse primero. Basándose en los modelos estructurales de BDD, las 3 cisteínas libres de BDD no se pueden PEGilar sin desnaturar antes la proteína para exponer estas cisteínas al reactivo de PEG. Por lo tanto, no parece factible conseguir una PEGilación específica de BDD por PEGilación de los restos de cisteína nativos sin alterar drásticamente la estructura de BDD, lo que muy probablemente alterará su función.

El estado redox de las 4 cisteínas del dominio B del FVIII de longitud completa es desconocido. La PEGilación de las 4 cisteínas del dominio B puede ser posible si no forman disulfuros y están expuestas en la superficie. Sin embargo, debido a que el FVIII de longitud completa y el BDD tienen un perfil farmacocinético similar (PK) y semividas similares in vivo (Gruppo y col., 2003, Haemophilia 9, pp. 251-260), es improbable que la PEGilación del dominio B dé como resultado una semivida plasmática mejorada a menos que el PEG también proteja las regiones no del dominio B.

Para determinar el sitio predefinido en un polipéptido que tenga actividad de FVIII por unión a un polímero que mantenga la actividad del factor VIII y mejore la farmacocinética, se presentan las siguientes directrices basándose en el BDD del FVIII. Las modificaciones deberían dirigirse a los mecanismos de aclaramiento, inactivación e inmunogénicos tal como a los sitios LRP, HSPG, APC, y de unión a anticuerpos inhibidores. Stoilova-McPhie, S. y col., 2002, Blood 99(4), pp. 1215-23 muestra la estructura del BDD. Por ejemplo, para prolongar la semivida, se puede introducir un único PEG en un sitio específico en o cerca de los sitios de unión a LRP en los restos 484-509 de A2 y 1811-1818 de A3. La introducción de un PEG voluminoso en estos sitios debería alterar la capacidad del FVIII para unirse a LRP y reducir el aclaramiento de FVIII de la circulación. También se cree que para prolongar la semivida sin afectar significativamente la actividad, se puede introducir un PEG en el resto 1648, que está en la unión del dominio B y el dominio A3 en la molécula de longitud completa y en el engarce I del aminoácido 14 del BDD entre los dominios A2 y A3.

La especificidad de la PEGilación se puede conseguir modificando restos de cisteína únicos en los dominios A2 y A3 utilizando técnicas de mutagénesis de ADN recombinante seguido por PEGilación específica del sitio de la cisteína

introducida con un reactivo PEG específico de cisteína tal como PEG-maleimida. Otra ventaja de PEGilar en 484-509 y 1811-1818 es que estos dos epítomos representan dos de las tres clases principales de sitios antigénicos inhibidores en los pacientes. Para conseguir el máximo efecto de semivida circulante mejorada y reducción de respuesta inmunogénica, tanto los sitios de unión a LRP en A2 y A3 se pueden PEGilar para producir un producto diPEGilado. Se debería señalar que la PEGilación en la región 1811-1818 puede dar lugar a una pérdida de actividad significativa ya que esta región está implicada también en la unión al FIX. La PEGilación dirigida al sitio en 558-565 debería abolir la unión a HSPG, pero también reduce la actividad ya que esta región también se une al FIX.

Sitios de superficie adicionales que se pueden PEGilar para identificar nuevos mecanismos de aclaramiento de FVIII. La PEGilación del dominio A2 puede ofrecer ventajas adicionales ya que el dominio A2 se disocia de FVIII al activarse y presumiblemente se retira de la circulación más rápido que el resto de la molécula de FVIII debido a su menor tamaño. El A2 PEGilado, por otra parte, puede ser lo suficientemente grande para escapar al aclaramiento renal y tener una semivida plasmática comparable al resto de FVIII y por lo tanto puede reconstituir el FVIII activado in vivo.

IDENTIFICACION DE SITIOS DE PEGILACIÓN EN LAS REGIONES A2 Y A3. Se seleccionaron cinco posiciones (Y487, L491, K496, L504 y Q468 que se corresponden con las posiciones PEG1-5) en o cerca de la supuesta región de unión a LRP en A2 como ejemplos para la PEGilación dirigida al sitio basándose en la alta exposición en la superficie y la dirección hacia fuera de su trayectoria α to β . Además, estos restos son más o menos equidistantes entre ellas en la estructura tridimensional de la molécula, de manera que juntos pueden representar esta región completa. Se seleccionaron ocho posiciones (1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803, 1804 que se corresponden con las posiciones PEG6-14) en o cerca de la supuesta región de unión a LRP en A3 como ejemplos para la PEGilación dirigida al sitio. El PEG6 está adyacente a 1811-1818 y el sitio natural de glicosilación unido a N en 1810. La PEGilación en la posición 1810 (PEG7) sustituirá el azúcar con un PEG. La mutación en la posición PEG8 T1812 también abolirá el sitio de glicosilación. Aunque se predijo que la posición PEG9 (K1813) apuntaba hacia dentro, se seleccionó en el caso de que el modelo de estructura no fuera correcto. PEG10 (Y1815) es un aminoácido hidrófobo voluminoso en el bucle de unión a LRP, y puede ser un resto de interacción crítica ya que los aminoácidos hidrófobos se encuentran normalmente en el centro de las interacciones proteína-proteína. Debido a que se ha expuesto que la región 1811-1818 está implicada en la unión tanto con LRP como con FIX, se pensó que la PEGilación en este bucle posiblemente daría como resultado una reducción de la actividad. Por lo tanto, PEG11-PEG14 (1795, 1796, 1803, 1804) se diseñaron para que estuvieran cerca del bucle 1811-1818 pero no en el bucle de manera que se pudiera disociar la unión a LRP de FIX con diferentes tamaños de PEG.

Para bloquear ambos sitios de unión a LRP simultáneamente, se puede generar una PEGilación doble en, por ejemplo, la posición PEG2 y PEG8.

Como se ha demostrado que la región 558-565 se une tanto a HSPG como a FIX, no se diseñaron sitios en esta región. En vez de eso, se diseñaron PEG15-PEG17 (377, 378, y 556) entre las regiones de unión a LRP y HSPG en A2 de manera que un PEG unido pueda interferir ambas interacciones y altere las posibles interacciones entre ellas. También se podrían seleccionar sitios adicionales que estén expuestos en la superficie y apuntando hacia afuera en o cerca de las regiones de unión a LRP y HSPG. Para identificar nuevos mecanismos de aclaramiento, se puede PEGilar sistemáticamente el FVIII. Además de PEG1-17, se pueden utilizar los otros tres sitios de glicosilación naturales, a saber, N41, N239, y N2118 que se corresponden con PEG18-20 como puntos de unión para la PEGilación ya que deberían estar expuestos en la superficie. Las áreas de superficie con un radio de 20 angstroms desde los átomos C β de PEG2, PEG6 y los cuatro sitios de glicosilación se mapearon en el modelo BDD además de los sitios de interacción funcional para vWF, FIX, FX, fosfolípidos y trombina.

Después se seleccionaron PEG21-29 que se corresponden con Y81, F129, K422, K523, K570, N1864, T1911, Q2091, y Q2284 basándose en su capacidad para cubrir prácticamente toda la superficie restante de BDD con un radio de 20 angstroms desde cada uno de sus átomos C β . Estas posiciones se seleccionaron también debido a que están completamente expuestas, apuntando hacia fuera, y lejos de las cisteínas naturales para minimizar la posible formación incorrecta de disulfuros. El radio de 20 angstroms se escogió debido a que se espera que un PEG grande, tal como un PEG ramificado de 64 kD, tenga el potencial de cubrir una esfera con un radio de aproximadamente 20 angstroms. La PEGilación de PEG21-29 junto con PEG2 y PEG6 y los sitios de glicosilación PEG18, 19, y 20 es probable que protejan prácticamente toda la superficie no funcional del FVIII.

Las posiciones de PEGilación que dan lugar al aumento de las propiedades tales como un perfil PK mejorado, mayor estabilidad, o inmunogenicidad reducida se pueden combinar para generar un producto multi-PEGilado con propiedades aumentadas al máximo. El PEG30 y PEG31 se diseñaron para retirar los disulfuros expuestos en los dominios A2 y A3, respectivamente. El PEG30, o C630A, debería liberar su pareja de disulfuro C711 para la PEGilación. De la misma manera, el PEG31, C1899A debería permitir que el C1903 se PEGile.

MUTAGÉNESIS. Los sustratos para la PEGilación dirigida al sitio de FVIII se pueden generar introduciendo un codón de cisteína en el sitio escogido para la PEGilación. Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio cQuickChange™ II de Stratagene para fabricar todos los mutantes de PEG (kit Stratagene 200523 de Stratagene Corporation, La Jolla, CA). El procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio cQuickChange™ se llevó a cabo utilizando la ADN polimerasa Pfu Turbo® y un ciclador de temperatura. Se alargaron dos oligonucleótidos cebadores

incluidos, que contenían la mutación deseada utilizando la Pfu Turbo, la cual no desplazaba los cebadores. Se utilizó el gen de FVIII tipo silvestre que contenía el dsADN como matriz. A continuación de los múltiples ciclos de elongación, el producto se digirió con la endonucleasa DpnI, que es específica para el ADN metilado. El ADN recién sintetizado, que contenía la mutación, no está metilado, mientras que el ADN parental de tipo silvestre está metilado. El ADN digerido se utiliza entonces para transformar células supercompetentes de XL-1 Blue.

La eficacia de la mutagénesis es de casi el 80 %. Las reacciones de mutagénesis se llevaron a cabo en pSK207+BDD C2.6 o pSK207+BDD (Figura 1). La mutagénesis satisfactoria se confirmó por secuenciación de ADN y los fragmentos apropiados, que contenían la mutación, se transfirieron a la matriz de FVIII en el vector de expresión de mamífero pSS207+BDD. Tras la transferencia, se confirmó la secuencia de todas las mutaciones. Para las muteínas de A3 se hicieron las mutagénesis de PEG 6, 7, 8, 9 Y 10, en el vector pSK207+BDD C2.6. Tras confirmarse por secuenciación, el fragmento mutante, KpnI/Pme se subclonó en pSK207+BDD. La muteína BDD se subclonó entonces en el vector de expresión pSS207+BDD. Para las muteínas de A3 PEG 11, 12, 13, 14, la mutagénesis se hizo directamente en el vector pSK207+BDD y la secuencia confirmada de BDD mutante se subclonó en pSS207+BDD. Para las muteínas A2 PEG 1, 2, 3, 4,5, la mutagénesis se hizo en el vector pSK207+BDD C2.6. La secuencia mutante confirmada se subclonó en pSK207+BDD y después en pSS207+BDD.

SE ENUMERAN LOS CEBADORES (SOLO EN SENTIDO DIRECTO) QUE SE UTILIZAN PARA MUTAGÉNESIS PARA CADA REACCION:

PEG1, Y487C: GATGTCCGTCCTTTGTGCTCAAGGAGATTACCA (SEQ ID NO: 5)

PEG2, L491C: TTGTATTCAAGGAGATGCCCAAAAGGTGTA AAC (SEQ ID NO: 6)

PEG3, K496C: TTACCAAAAGGTGTATGCCATTTGAAGGATTTTC (SEQ ID NO: 7)

PEG4, L504C: AAGGATTTTCCAATTTGCCCAGGAGAAATATTC (SEQ ID NO: 8)

PEG5, Q468C: GATTATATTTAAGAATTGCGCAAGCAGACCATAT (SEQ ID NO: 9)

PEG6, K1808C: TAGAAAAACTTTGTCTGCCCTAATGAAACCAAAAC (SEQ ID NO: 10)

PEG7, N1810C: AACTTTGTCAAGCCTTGCGAAACCAAACTTAC (SEQ ID NO: 11)

PEG8, T1812C: GTCAAGCCTAATGAATGCAAACTTACTTTTGGGA (SEQ ID NO: 12)

PEG9, K1813C: CAAGCCTAATGAAACCTGCACTTACTTTTGGAAAG (SEQ ID NO: 13)

PEG10, Y1815C: CTAATGAAACCAAACTTGCTTTTGGAAAGTGCAAC (SEQ ID NO: 14)

PEG11, D1795C: ATTTCTTATGAGGAATGCCAGAGGCAAGGAGCA (SEQ ID NO: 15)

PEG12, Q1796C: TCTTATGAGGAAGATTGCAGGCAAGGAGCAGAA (SEQ ID NO: 16)

PEG13, R1803C: CAAGGAGCAGAACCTTGCAAAACTTTGTCAAGCCT (SEQ ID NO: 17)

PEG14, K1804C: GGAGCAGAACCTAGATGCAACTTTGTCAAGCCT (SEQ ID NO: 18)

PEG15, K377C: CGCTCAGTTGCCAAGTGTCTCCTAAA ACTTGG (SEQ ID NO: 19)

PEG16, H378C: TCAGTTGCCAAGAAGTGTCTAAA ACTTGGGTA (SEQ ID NO: 20)

PEG17, K556C: CTCCTCATCTGCTACTGCGAATCTGTAGATCAA (SEQ ID NO: 21)

PEG18, N41C: CAAAATCTTTTCCATTCTGCACCTCAGTCGTGTAC (SEQ ID NO: 22)

PEG19, N239C: GTCAATGGTTATGTATGCAGGTCTCTGCCAGGT (SEQ ID NO: 23)

PEG20, N2118C: CAGACTTATCGAGGATGTTCCACTGGAACCTTA (SEQ ID NO: 24)

PEG21, Y81C: ATCCAGGCTGAGGTTTGTGATACAGTGGTCATT (SEQ ID NO: 25)

PEG22, F129C: GAAGATGATAAAGTCTGTCTGGTGGAAAGCCAT (SEQ ID NO: 26)

PEG23, K422C: CAGCGGATTGGTAGGTGTTACAAAAAGTCCGA (SEQ ID NO: 27)

PEG24, K523C: GAAGATGGGCCAACTTGCTCAGATCCTCGGTGC (SEQ ID NO: 28)

PEG25, K570C: CAGATAATGTCAGACTGCAGGAATGTCATCCTG (SEQ ID NO: 29)

PEG26, N1864C: CACTAACACACTGTGTCTGCTCATGGGAGA (SEQ ID NO: 30)

PEG27, T1911C, CAGATGGAAGATCCCTGCTTTAAAGAGAATTAT (SEQ ID NO: 31)

PEG28, Q2091C: ACCCAGGGTGCCCGTTGCAAGTTCTCCAGCCTC (SEQ ID NO: 32)

PEG29, Q2284C: AAAGTAAAGGTTTTTTGCGGAAATCAAGACTCC (SEQ ID NO: 33)

PEG30, C630A: TTGCAGTTGTGAGTTGCTTTGCATGAGGTGGCA (SEQ ID NO: 34)

5 PEG31, C1899A: AATATGGAAAGAAACGCTAGGGCTCCCTGCAAT (SEQ ID NO: 35)

EXPRESIÓN DE MUTEÍNAS. Tras la inserción en un vector que da lugar a resistencia a Higromicina B, las muteínas PEG se transfectaron en células HKB11 (Patente de EE. UU. 6.136.599) formando un complejo con el reactivo de transfección Fectin 293 (Invitrogen Corp. nº de Cat. 12347-019) según las instrucciones del fabricante. Se evaluó la expresión de FVIII a los tres días post-transfección por el ensayo cromogénico Coatest (Chromogenix Corp. nº de cat. 821033, véase el Ejemplo 12. Ensayo cromogénico) (Tabla 1). Las células transfectadas se colocaron entonces bajo presión selectiva con 50 µg/ml de Hig. B en un medio de cultivo suplementado con un 5 % de FBS. Cuando aparecieron las colonias resistentes a Hig B, se recolectaron manualmente y se exploraron en cuanto a la expresión de FVIII por el ensayo cromogénico Coatest. Las células que expresaban FVIII establemente se adaptaron entonces a un medio que contenía un suplemento HPPS. Las células se expandieron y sembraron a 1×10^6 células/ml en matraces con agitado con medio reciente. El fluido de cultivo tisular (TCF), recolectado tras 3 días, se utilizaron para la purificación de muteínas BDD de FVIII. La actividad de FVIII del TCF se ensayó por el Coatest (Tabla 1).

Sumario de los títulos de muteína de PEG

Tabla 1. Nivel de expresión de muteínas PEG de transfecciones transitorias y estables

Mutación	Muteína ID	Título (UI/ml)	
		Transitoria	Células estables
Y487C	PEG1	0,07	N/A
L491C	PEG2	0,60	1,96
K496C	PEG3	0,45	N/A
L504C	PEG4	0,38	5,57
Q468C	PEG5	0,69	8,14
K1808C	PEG6	0,54	2,73
N1810C	PEG7	0,21	0,5
T1812C	PEG8	0,16	N/A
K1813C	PEG9	0,35	7,74
Y1815C	PEG10	0,09	N/A
D1795C	PEG11	0,27	N/A
Q1796C	PEG12	0,29	N/A
R1803C	PEG13	0,11	N/A
K1804C	PEG14	0,18	1,14
L491C/K1808C	PEG2+6	0,11	2,48
L491C/K1804C	PEG2+14	0,13	7,19
K377C	PEG15	0,11	12,58
H378C	PEG16	0,15	0,97
K556C	PEG17	0,09	0,15
N41C	PEG18	0,05	N/A
N239C	PEG19	0,16	N/A
N2118C	PEG20	0,13	N/A
Y81C	PEG21	0,36	N/A
F129C	PEG22	0,25	2,55
K422C	PEG23	0,28	N/A
K523C	PEG24	< 0,05	N/A
K570C	PEG25	< 0,05	N/A
N1864C	PEG26	0,15	N/A
T1911C	PEG27	0,28	N/A
Q2091C	PEG28	0,20	N/A
Q2284C	PEG29	0,17	N/A
C630A	PEG30	< 0,05	0,20
C1899A	PEG31	0,30	1,80

20 PURIFICACIÓN DE MUTEÍNAS. Al recolectar el sobrenadante del cultivo celular que contiene la muteína secretada del FVIII proteico, se filtró el sobrenadante a través de un filtro de membrana de 0,2 micrómetros para retirar las células restantes. El sobrenadante se concentró entonces por ultrafiltración o intercambio aniónico. Entonces se

aplicó en una columna de inmunoafinidad donde los componentes del medio de cultivo celular y la mayoría de las impurezas proteicas de la célula huésped se retiran. El eluido de la columna de inmunoafinidad se intercambia de tampón por diafiltración en un tampón de formulación que contiene sacarosa y se congela. Se evaluó el rendimiento y recuperación de proteínas a través de una columna de anticuerpo monoclonal de FVIII mediante un ensayo cromogénico. Las muestras de la carga, flujo continuo, distintas fracciones del eluido, tira, y eluido diafiltrado de la ejecución de la cromatografía se ensayaron en cuanto a la actividad de FVIII (Tabla 2). La Tabla 2 muestra la recuperación de la muteína PEG2 de una columna de anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos eran anticuerpos C7F7. El porcentaje de recuperación de la Tabla 2 se determinó por el ensayo cromogénico. El rendimiento final era de un 73 %. Se muestra en la Figura 2 un gráfico de la absorbancia UV a 280 nm con respecto al tiempo para la proteína PEG2 purificada sobre una columna de cromatografía de anticuerpo monoclonal de FVIII. La cromatografía se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía AKTA® Explorer 100 de Amersham Bioscience. Este instrumento emplea un monitor visible de multi-longitudes de onda UV y una celda de flujo de 2 mm. La muteína PEG2 se eluyó de la columna en presencia de alta sal y el pico de elución se indica tanto por la absorbancia a 280 nm como por el ensayo de actividad FVIII.

Tabla 2. Recuperación de la muteína PEG2 a partir de la columna de anticuerpo monoclonal de FVIII

Etapa	% de recuperación
C7F7 de carga	100
C7F7 de flujo continuo	1,1
C7F7 de lavado	0,2
C7F7 Eluido	86
C7F7 tira	0,0
Post UF/DF	73

PEGILACIÓN. El FVIII o BDD no se puede PEGilar por PEG específicos de cisteína sin reducción y desnaturalización en una relación de un exceso de 100 veces de PEG: proteína (datos no mostrados), lo que confirma la hipótesis que se basa en el modelo de la estructura de BDD en el que todas las cisteínas nativas forman disulfuros o están escondidas dentro de la FVIII. Las muteínas de cisteína en FVIII que se expresan y purifican utilizando los protocolos convencionales enumerados anteriormente no se pueden PEGilar con un reactivo PEG-maleimida específico de cisteína, presumiblemente porque la cisteína introducida en FVIII está "protegida" porque reacciona con grupos sulfhidrilos tales como cisteína y β -mercaptoetanol presentes en el medio de cultivo celular. Este problema se puede resolver potencialmente eliminando las cisteínas y el β -mercaptoetanol del medio de cultivo, pero esto da lugar a una menor producción de FVIII y no evitaría que los sulfhidrilos liberados por las células bloqueen la cisteína introducida en el FVIII.

En otro aspecto de la invención, se desarrolló un procedimiento en tres etapas que permitía la PEGilación de FVIII específica del sitio (Figura 3). En la etapa 1, la muteína de cisteína en FVIII purificada a aproximadamente 1 μ M se reduce medianamente con reductores tales como aproximadamente 0,7 mM de Tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) o 0,07 mM de ditioneitol (DTT) durante 30 minutos a 4 °C para liberar la "protección". En la etapa 2, el reductor se elimina junto con la "protección" por un procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) tal como pasando la muestra a través de una columna con centrifugación (BioRad®) para permitir que se vuelvan a formar los sulfhidrilos de FVIII a la vez que se deja libre y reducida la cisteína introducida. En la etapa 3, al menos 30 minutos después de eliminar el reductor, la muteína de cisteína en FVIII liberada se trata con al menos un exceso molar de 10 veces de PEG-maleimida con tamaños que varían desde 5 a 64 kD (Nektar Therapeutics y N.O.F. Corporation) durante al menos 1 hora a 4 °C. Este procedimiento produce altamente un perfil de producto constante con datos reproducibles durante docenas de reacciones repetidas por diferentes individuos.

Debido a que el procedimiento de columna con centrifugación para retirar el TCEP no es escalable, se seleccionó la cromatografía de des-salado por filtración en gel. Sin embargo, al ensayar este procedimiento utilizando una muestra de vertido de TCEP, se demostró que faltaba el TCEP eluido con niveles medibles en la columna y no solo en la fracción de sal como sería esperable de una molécula con su bajo peso molecular. Los ensayos de transferencia de Western mostraban una PEGilación de fondo significativa probablemente debido a la eliminación incompleta del TCEP. Entre tanto, experimentos separados mostraron que el material de C7F7 purificado podía purificarse adicionalmente de otras impurezas proteicas utilizando un medio de cromatografía de intercambio aniónico combinado con un gradiente salino. Entonces se decidió reducir el material C7F7 con TCEP como se ha descrito anteriormente y después procesar el material sobre la columna de intercambio aniónico. Debido a la diferencia de carga el FVIII proteico se retendría mientras que el TCEP fluiría a través de la columna y no se retendría. Al mismo tiempo, durante la elución en gradiente salino el FVIII proteico se purificaría de la mayoría de las impurezas proteicas restantes. Esto significa que la última PEGilación que se produce sería teóricamente más homogénea con un material de partida más puro. Sin embargo, al ensayar con una muestra de vertido de TCEP, se demostró que se encontraban niveles de TCEP medibles eluyéndose en el gradiente con el FVIII. Por lo tanto, se decidió implementar una cromatografía de des-salado por filtración en gel después de la cromatografía de intercambio aniónico de manera que estas dos etapas cuando se utilizan secuencialmente darían como resultado la eliminación completa del TCEP y la eliminación de la PEGilación no específica.

ANÁLISIS DE PEGILACIÓN POR SDS PAGE Y TRANSFERENCIA DE WESTERN. El producto PEGilado se puede analizar por electroforesis en un gel de poliacrilamida de SDS con un 6 % de Tris glicina reducido (Invitrogen). A continuación de la electroforesis, el gel se puede teñir con Azul de Coomassie para identificar todas las proteínas o se sometieron a un protocolo de transferencia de Western convencional para identificar el patrón de PEGilación en diferentes regiones del FVIII. La tinción de la transferencia con un anticuerpo monoclonal de ratón R8B12 o C7F7 producidos contra la región del extremo C de la cadena pesada del FVIII o la región del extremo N de la cadena ligera del FVIII, respectivamente, debería identificar la PEGilación de las respectivas cadenas. La tinción con el anticuerpo 413 contra la región 484-509 del FVIII determinará si la PEGilación además es específica del sitio o no para muteínas tales como las PEG1-4. De la misma manera, la tinción con el anticuerpo CLB-CAG A que reconoce la región 1801-1823 del FVIII determinará si la PEGilación es específica del sitio o no para las muteínas PEG6-10.

Se demostró que la PEGilación de PEG2 (L491C) era selectiva para la cadena pesada sobre la cadena ligera y particularmente selectiva para la región 484-509 (Figura 4) mientras que se demostró que PEG6 (K1808C) era selectiva para la cadena ligera sobre la cadena pesada (Figura 5).

Para el estudio representado en la Figura 4, la muteína PEG2 (calles 1 y 8) se reduce con TCEP seguido por la eliminación de TCEP (calles 2 y 9) y el tratamiento con PEG-maleimida de 5, 12, 22, 33, o 43 kD (calles 3-7 y 10-14). El FVIII no PEGilado se ejecuta como bandas sin procesar (H+L) y cadenas pesada (H) y ligera (L) procesadas. Las tres bandas se detectan en gel teñido con Azul de Coomassie (inferior derecha) mientras que la tinción de Western con anticuerpos específicos de cadena revela solo la cadena sin procesar y la correspondiente. Utilizando la tinción con R8B12 (superior izquierda), la banda de la cadena pesada (H) está drásticamente reducida en intensidad cuando se trata el PEG2 con PEG-maleimida y se crea una nueva banda que corre más alto que la banda H parental proporcional al tamaño del PEG. Utilizando la tinción de C7F7 (inferior izquierda), las bandas de cadena ligera (L) (múltiples bandas debido a la glicosilación heterogénea) no cambia de intensidad. La banda H+L sin procesar para ambas tinciones cambian porque la cadena H es parte del FVIII sin procesar. La tinción con Coomassie también confirma mucha más PEGilación de la cadena pesada, es decir, reducción de la intensidad de la banda H, que la de la cadena ligera. Finalmente, las bandas PEGiladas pierden relativamente más intensidad en la tinción con el anticuerpo 413 (superior derecha) que la tinción con R8B12 de una manera dependiente del tamaño del PEG presumiblemente debido a la PEGilación específica del sitio de 491, que bloquea la unión del anticuerpo 413 a 484-509. Las cantidades de FVIII cargado por calle son de aproximadamente 30 ng para los dos geles de la izquierda, aproximadamente 1000 ng para el gel superior a la derecha, y aproximadamente 2000 ng para el gel inferior a la derecha.

La reducción seguida por la eliminación del reductor no cambia la migración del FVIII (calle 1 vs. 2 y 8 vs. 9). La adición de PEG de 22 kD a PEG2 bloquea la unión del anticuerpo 413, que es consistente con la PEGilación específica en la posición 491 (Figura 4, gel superior a la derecha). Esto sugiere también que el PEG2 PEGilado tendrá una menor inmunogenicidad en el hombre debido a que se ha demostrado que el anticuerpo 413 comparte el mismo epítipo que los anticuerpos inhibidores humanos de A2 (Scandella y col., 1992, *Thromb. Haemost.* 67, pp. 665-71).

Para el estudio representado en la Figura 5, la muteína PEG6 se reduce con TCEP seguido por la eliminación del TCEP (calles 1 y 6) y el tratamiento con PEG-maleimida de 5, 12, 22, o 33 kD (calles 2-5 y 7-10). El FVIII no PEGilado corre como bandas de no procesado (H+L) y de cadena pesada (H) y ligera (L) procesadas. Debido a que la mutación del PEG6 (K1808) reside en la cadena ligera, se detectó PEGilación solo en la cadena ligera y no en la cadena pesada. La cantidad de FVIII cargada por calle es aproximadamente de 100 ng para el gel de la izquierda y aproximadamente 30 ng para el gel de la derecha.

El BDD que corrió como control no mostraba PEGilación significativa con el tratamiento con un exceso molar de más de 100 veces de PEG-maleimida incluso tras el procedimiento de reducción y eliminación del reductor descrito anteriormente (Figura 6a). El mismo procedimiento se aplicó también a PEG4 y PEG5 (Figura 6a). En comparación con PEG2, estas muteínas no se PEGilaban tan eficazmente, pero eran selectivas para la cadena pesada de manera similar al PEG2 (L491C). La eficacia de PEGilación del PEG6 (K1808C) es relativamente baja, quizá debido a que está muy cerca del sitio de glicosilación unido a N en N1810, que puede bloquear la PEGilación en la posición 1808. Por lo tanto, los inventores diseñaron el PEG7 (N1810C) para eliminar el sitio de glicosilación nativo en 1810. El PEG7 muestra una eficacia de PEGilación mejorada en comparación con PEG6 en una comparación directa (Figura 6b). De manera similar el PEG15 muestra una eficacia de PEGilación ligeramente mejor que PEG2. El PEG2+6, un doble mutante de BDD, puede PEGilarse en ambas cadenas pesada y ligera ya que PEG2 es una mutación de cisteína en la cadena pesada mientras que PEG6 es una mutación de cadena ligera (Figura 6c). Este procedimiento también se aplicó al FVIII tipo silvestre de longitud completa (Figura 6d). La PEGilación se detectó para el fragmento más grande de la cadena pesada que incluye el dominio A1, A2 y la mayoría del B. El patrón de PEGilación sugiere monoPEGilación y que solo hay una única cisteína PEGilada.

ANÁLISIS DE PEGILACIÓN POR ESCISIÓN POR TROMBINA Y TRANSFERENCIA DE WESTERN. El producto PEGilado se puede tratar con trombina (40 UI/ug de FVIII) a 37 °C durante 30 minutos. La trombina que se utilizó también contenía APC como contaminante. La escisión por trombina generará los dominios A1 de 50 kD y A2 de 43 kD (Figura 7). La tinción con el anticuerpo R8B12, que reconoce el extremo C de la cadena pesada, identificará solo el dominio A2 intacto y el fragmento de 21 kD del extremo C (FVIII 562-740). Por lo tanto, si la PEGilación de PEG2

era específica para la posición 491, el dominio A2 de 43 kD debería estar PEGilado, pero no el fragmento del extremo C de 21 kD. Esto se confirmó además por transferencia de Western para el fragmento PEG2 PEGilado de 22 kD que se muestra en la Figura 7. Por lo tanto, por eliminación, la PEGilación de PEG2 se ha localizado en el fragmento de 22 kD del extremo N (FVIII 373-561) del dominio A2. Como el PEG-maleimida es completamente selectivo para las cisteínas a pH 6,8 y las únicas cisteínas del FVIII nativo en 373-561 vienen de un disulfuro escondido entre 528 y 554, es muy probable que el PEG2 PEGilado sea en la cisteína introducida en la posición 491. La tinción de Western del PEG2 PEGilado tratado con trombina con un anticuerpo contra el extremo N de la cadena pesada de FVIII no mostraba PEGilación en el dominio A1 (datos no mostrados). La PEGilación selectiva de PEG2 que utiliza el procedimiento de escisión por trombina también se ha confirmado para los PEG 5, 12, 33, y 43 kD (datos no mostrados). La escisión por trombina del FVIII tipo silvestre de longitud completa PEGilado muestra que solamente el dominio B está PEGilado (Figura 8).

ANÁLISIS DE PEGILACIÓN POR TINCIÓN CON YODO. Para confirmar que las bandas recién formadas en la tinción con Azul de Coomassie y Western eran además bandas PEGiladas, se utilizó la tinción con bario-yodo, que es específica para el PEG (Figura 9). El PEG2 PEGilado se corrió en un gel con un 6 % de Tris-glicina (Invitrogen) y se tiñó con el anticuerpo R8B12 de cadena pesada o una solución de bario-yodo (Lee y col, Pharm Dev Technol. 1999 4:269-275). Las bandas PEGiladas coincidían en las dos tinciones utilizando el marcador de peso molecular para alinearlas, confirmando de esta manera la PEGilación de la cadena pesada del FVIII.

ANÁLISIS DE PEGILACIÓN POR ESPEC. DE MASAS-MALDI. Para confirmar la PEGilación del dominio A2 en la cadena pesada, se analizó la muestra de rFVIII, antes y después de la PEGilación por espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Las muestras se mezclaron y cristalizaron en la placa diana MALDI con una matriz de ácido sinapínico en un 30 % de acetonitrilo, un 0,1 % de TFA. Se analizaron entonces en un espectrómetro Voyager DE-POR en modo positivo, lineal. Los resultados, que se muestran en la Figura 10, presentaban la cadena ligera de PEG2 centrada en 83 kD y la cadena pesada (HC) en 89 kD. El espectro adquirido para la muestra PEGilada mostraba una caída del pico HC y se formaba un nuevo pico centrado a 111 kD. Esto confirma la PEGilación de la cadena pesada. No se observó cadena ligera PEGilada (en 105 kD) por encima del límite de detección.

Entonces las muestras se sometieron a digestión por trombina con 20 unidades de trombina/mg de FVIII a 37 °C durante 30 minutos, seguido por la determinación de la concentración de FVIII por análisis de aminoácidos (Commonwealth Biotechnologies, Inc). La cadena pesada se escindió en una fracción del extremo N de 46 kD (A1) y una fracción de 43 kD (A2). El espectro MALDI adquirido para la muestra PEGilada (Figura 11) muestra la pérdida del pico de 43 kD y el desarrollo de un nuevo pico de 65 kD, debido al dominio A2 PEGilado. La PEGilación de la LC de nuevo no se observa por encima del límite de detección. Estos resultados confirman de nuevo la PEGilación del dominio A2 de FVIII. El mismo análisis se aplicó al PEG6 PEGilado, confirmando la PEGilación del fragmento de cadena ligera A3 C1 C2 (Figura 12).

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD

ENSAYO DE COAGULACIÓN. El procedimiento de ensayo de coagulación FVIII:C es un ensayo de una etapa que se basa en el tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT). El FVIII actúa como un cofactor en presencia del Factor IXa, calcio, y fosfolípidos en la conversión enzimática del Factor X a Xa. En este ensayo, las muestras de ensayo diluidas se incuban a 37 °C con una mezcla de sustrato de plasma deficiente en FVIII y reactivo para aPTT. Se añade cloruro de calcio a la mezcla incubada y se inicia la coagulación. Existe una relación inversa entre el tiempo (segundos) que se toma para la formación del coágulo y el logaritmo de la concentración de FVIII:C. Los niveles de actividad de muestras desconocidas se interpolan por comparación de los tiempos de coagulación de distintas diluciones de material de ensayo con una curva construida a partir de una serie de diluciones de material de referencia de actividad conocida y se presentan en unidades internacionales por ml (UI/ml).

ENSAYO CROMOGÉNICO. El procedimiento del ensayo cromogénico consiste de dos etapas consecutivas donde la intensidad del color es proporcional a la actividad de FVIII. En la primera etapa, se activa el Factor X a Factor Xa por el FIXa con su cofactor, el FVIIIa, en presencia de cantidades óptimas de iones de calcio y fosfolípidos. Están presentes cantidades en exceso de Factor X de manera que la tasa de activación del Factor X solamente depende de la cantidad de FVIII. En la segunda etapa, el Factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico para dar lugar a un cromóforo y se lee la intensidad de color fotométricamente a 405 nm. La potencia desconocida se calcula y se comprueba la validez del ensayo con un procedimiento estadístico de relación de pendiente. La actividad se presenta en Unidades Internacionales por ml (UI/ml).

El bucle 1811-1818 está implicado en la unión a FIX, pero la importancia de las posiciones individuales en este bucle no se han determinado. Las muteínas PEG7-10 presentan una actividad cromogénica casi idéntica respecto al FVIII nativo (Tabla 3). La Tabla 3 muestra el porcentaje de actividad específica (S.A.) de las muteínas PEG y el PEG2 PEGilado o el PEG6 con respecto a BDD. La S.A. se determinó dividiendo la actividad cromogénica, de coagulación, o de unión a vWF por el valor del antígeno total en ELISA (TAE). La S.A. de muteínas PEGiladas se divide entonces por la S.A. de BDD (8 UI/ug cromogénica, 5 UI/ug de coagulación, y 1 de vWF/TAE) y multiplicando por 100 para obtener el porcentaje de S.A. enumerado en la Tabla bajo los títulos cromogénica, coagulación y vWF/TAE.

Tabla 3. Porcentaje de actividad específica (S.A.) de muteínas de PEG y PEG2 y PEG6 PEGilados con respecto a BDD

	Mutación	Cromogénica	Coagulación	vWF/TAE
BDD		100	100	100
PEG1	Y487C			
PEG2	L491C	125	130	138
PEG2 rojo	L491C	137	141	98
PEG2-5 kD PEG	L491C	124	93	125
PEG2-12 kD PEG	L491C	118	25	71
PEG2-22 kD PEG	L491C	103	13	87
PEG2-33 kD PEG	L491C	130	17	59
PEG2-43 kD PEG	L491C	91	9	57
PEG3	K496C			
PEG4	L504C			
PEG5	Q468C	92		
PEG6	K1808C	83	60	100
PEG6-33 kD PEG	K1808C	42	6	90
PEG7	N1810C	100		
PEG8	T1812C	100		
PEG9	K1813C	83		
PEG10	Y1815C	75		
PEG11	D1795C			
PEG12	Q1796C			
PEG13	R1803C			
PEG14	K1804C			
PEG2+6	491C/1808C			
PEG15	K377C	82		
PEG16	H378C	126		
PEG17	K556C	43		
PEG18	N41C	80		
PEG19	N239C			
PEG20	N2118C	127		
PEG21	Y81C			
PEG22	F129C	83		
PEG23	K422C			
PEG24	K523C			
PEG25	K570C			
PEG26	N1864C			
PEG27	T1911C			
PEG28	Q2091C			
PEG29	Q2284C			

- 5 Como se utiliza en la Tabla 3, "PEG2 rojo" es la muteína PEG2 que se ha tratado con un reductor seguido por la eliminación del reductor. Este procedimiento de reducción no alteraba significativamente las tres actividades funcionales del FVIII. La muteína PEG2 conjugada con PEG varía desde 5 kD (PEG2-5 kD) a 43 kD (PEG2-43 kD) no perdía una cantidad significativa de actividad cromogénica, pero tenía una actividad de coagulación mucho menor según aumentaba el tamaño del PEG por encima de 5 kD. Puede haber una modesta reducción de la unión con vWF también para el PEG2 PEGilado de mayor tamaño.
- 10 ANTÍGENO TOTAL DE ELISA (TAE). Se capturó el FVIII en una placa de microtitulación que se había revestido con un anticuerpo policlonal de FVIII. El FVIII unido se detecta con un anticuerpo policlonal biotinilado de rFVIII y un conjugado de estreptavidina peroxidasa de rábano rústico (HRP). El complejo de peroxidasa-estreptavidina produce una reacción de color al añadirse el sustrato de tetrametilbencidina (TMB). Las concentraciones de muestra se interpolan a partir de una curva de referencia utilizando modelos ajustados de cuatro parámetros. Los resultados
- 15 de FVIII se presentan en µg/ml.
- ELISA DE UNIÓN A vWF. Se permitió que el FVIII se uniera al vWF en una solución de Plasma Hemofílico Grave. El complejo FVIII-vWF se capturó entonces en una placa de microtitulación que se había revestido con un anticuerpo monoclonal específico de vWF. El FVIII unido al vWF se detectó con un anticuerpo policlonal de FVIII y un conjugado anti-conejo-peroxidasa de rábano rústico. El complejo de anticuerpo conjugado con peroxidasa
- 20 produce una reacción de color al añadirse el sustrato. Las concentraciones de muestra se interpolaron a partir de una curva de referencia utilizando el modelo ajustado de cuatro parámetros. Los resultados de unión de FVIII se presentan en µg/ml. No existía un impacto significativo en ninguna de las actividades con la PEGilación, lo que sería consistente con la PEGilación del dominio B.

Tabla 4. Actividad específica (S.A.) del FVIII tipo silvestre de longitud completa (KG-2) antes y después de la PEGilación con diferentes tamaños de PEG

Muestra	TAE ug/ml	Ensayo de coagulación			Ensayo cromogénico			vWF ELISA		
		UI/ml	UI/ug	% de partida	UI/ml	UI/ug	% de partida	ug/ml	vWF/TAE	% de partida
KG-2 partida	1,31	4,8	3,6	100	5,60	4,3	100	0,42	0,32	100
Solo reducido	0,93	3,1	3,4	93	4,08	4,4	103			
KG-2-5 kD PEG	0,71	2,5	3,5	96	3,09	4,3	102			
KG-2-12 kD PEG	0,59	2,3	3,9	107	2,99	5,0	118			
KG-2-22 kD PEG	0,63	2,5	3,9	108	3,06	4,8	113	0,19	0,30	94
KG-2-30 kD PEG	0,59	2,5	4,1	114	3,01	5,1	119	0,19	0,32	100
KG-2-43 kD PEG	0,52	2,4	4,6	128	2,86	5,5	129			

5 PURIFICACION DE FVIII PEGILADO POR CROMATOGRFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO. El FVIII PEGilado se aplica en una columna de intercambio aniónico o una columna de intercambio catiónico donde la proteína se une a la columna mientras que cualquier exceso de reactivo de PEG libre no se une y se elimina en el flujo continuo. La muteína PEG se eluye entonces de la columna con un gradiente de cloruro sódico. Se utilizó un gel del 4-12 % Bis-Tris teñido con bario-yodo de carga, flujo continuo, y fracciones de gradiente para confirmar que las fracciones de la elución de la columna tenía la muteína PEGilada.

10 PURIFICACIÓN DE FVIII PEGILADO POR CROMATOGRFIA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO. Las fracciones del intercambio aniónico que contenían la mayoría de la muteína PEG2 se agruparon y concentraron por ultrafiltración se aplicaron en una columna de exclusión por tamaño. La columna se eluyó entonces utilizando el tampón de formulación. Debido a que la diferencia en tamaño y forma de la proteína depende de si está unido el PEG a la proteína, esta columna separa la muteína PEG2 PEGilada de cualquier PEG2 restante, que no esté PEGilado. Las fracciones de muteína de FVIII PEGiladas se agruparon basándose en que tuvieran la mayor actividad FVIII, entonces se congelaron para los estudios en animales posteriores y la caracterización molecular. La Figura 13 compara la elución de muteína PEG2 no PEGilada frente a la muteína PEG2 PEGilada de 43 kD. El PEG2 PEGilado se eluye significativamente antes, lo que indica un aumento de su tamaño y forma por el PEG unido covalentemente.

20 Con las muteínas tales como PEG6 que presentan eficacias menores de PEGilación, es decir, menor del 50 %, el esquema de purificación más eficaz para producir un producto mono-PEGilado altamente puro es utilizar una combinación de cromatografía de intercambio catiónico seguida por una cromatografía de exclusión por tamaño. Por ejemplo, con el PEG6, la cromatografía de intercambio catiónico purifica el PEG6 PEGilado (fracción de elución más temprana, Fig. 14) de la mayoría de PEG6 no PEGilado (fracción de elución más tardía, Fig. 15). La cromatografía de exclusión por tamaño entonces pule la proteína PEGilada (fracción de elución más temprana, Fig. 15) del resto de la proteína no PEGilada (fracción de elución más tardía, Fig. 15).

25 EFECTO DEL TAMAÑO DEL PEG SOBRE LA ACTIVIDAD. Para ensayar si los tamaños del PEG tienen un efecto en las actividades de coagulación y cromogénica de FVIII al PEGilarse, se redujeron el FVIII de longitud completa, PEG2, PEG6, y PEG14 con TCEP seguido por eliminación del reductor y la reacción con un tampón de control o PEG variando de 6 kD a 64 kD. El FVIII PEGilado resultante se ensayó directamente sin retirar el exceso de PEG ni el FVIII no PEGilado. Los experimentos de control mostraban que el exceso de PEG no tenía efecto en la actividad del FVIII.

30 La Fig. 16 muestra los resultados de este estudio. El FVIII de longitud completa purificado se representa como KG-2 en la Fig. 16. El porcentaje de actividad expuesto en la Fig. 16 se determinó dividiendo el valor de la muestra tratada con PEG tras la reducción y eliminación del reductor por el de la muestra tratada con tampón de control teniendo en consideración el rendimiento de PEGilación. Los rendimientos de PEGilación eran comparables en todos los PEG para una determinada construcción de FVIII Eran aproximadamente del 80 % para el KG-2, PEG2, y PEG14 y aproximadamente del 40 % para el PEG6. Por ejemplo, la eficacia de la PEGilación de PEG14 tratado con tampón de control tenía una actividad de coagulación de 6,8 UI/ml vs. 3,2 UI/ml para la muestra de PEG14 PEGilado con 12 kD. Sin embargo, la eficacia de PEGilación era de aproximadamente el 80 %, lo que significa que el 3,2 UI/ml representa la actividad agregada de aproximadamente el 80 % PEGilado y el 20 % no PEGilado. Asumiendo que la muestra no PEGilada tiene la misma actividad que el control de PEG tratado con tampón de control, el porcentaje de actividad de no PEGilado para el PEG14 PEGilado se calcula que es del 34 % = (3,2-6,8 veces el 20 %) / (6,8 veces el 80 %).

45 La PEGilación en el dominio A2 o A3 en la posición PEG2, PEG6 o PEG14 de BDD da lugar a pérdidas drásticas de la actividad de coagulación cuando el tamaño del PEG aumenta más allá de 6 kD. Sin embargo, la PEGilación del dominio B en una cisteína del dominio B nativa del FVIII de longitud completa no tuvo efectos sobre la actividad de coagulación. De manera interesante, la actividad cromogénica no se afectó por ninguna de las construcciones PEGiladas. Esto puede deberse a diferencias de ensayo. Es posible que el pequeño sustrato cromogénico peptídico

tiene un acceso más fácil para un complejo FVIII/FIX/FX PEGilado que el gran sustrato proteico utilizado en el ensayo de coagulación. De manera alternativa, el PEG puede afectar la activación de la mteína. Esto se debería detectar más fácilmente por el ensayo de coagulación de una etapa que en el ensayo cromogénico de dos etapas.

5 Para confirmar los efectos del PEG sobre la actividad de coagulación de PEG2, 6, y 14, se purificaron varias construcciones PEGiladas del exceso de PEG y no PEGiladas. Como el PEG no tiene efecto sobre la actividad cromogénica la relación actividad cromogénica respecto a coagulación es una buena estimación del efecto relativo del PEG sobre la actividad de coagulación (Tabla 5). Los PEG más grandes en una determinada posición tal como PEG2 y un alto número de PEG como en el caso de la construcción PEG2+6 inducen una pérdida mayor de actividad de coagulación.

10 *Tabla 5. Relación de cromogénica respecto a coagulación para el BDD PEGilado purificado. *PEG ramificado*

BDD PEGilado		Cromogénica UI/ml / Coagulación UI/ml	
ID de muestra	PEG	Relación bruta	Relación relativa a BDD
BDD	sin PEG	1,7	1
PEG2 (agrupamiento 2)	22 kD 491	9	5
PEG2	43 kD* 491	25	15
PEG6	12 kD 1808	5	3
PEG6 (antiguo)	33 kD 1808	13	7
PEG6 (nuevo)	33 kD 1808	8	5
PEG2+6 (LSP25)	33 kD en 491, Mono	10	6
PEG2+6 (LSP22)	33 kD en 491/1808, Di	24	14
PEG2+6 (ESP)	33 kD en 491/1808/A3, Tri	60	35
PEG22	64 kD* 129	14	8
PEG14	12 kD 1804	3,2	1,9
PEG14	20 kD* 1804	4,2	2,5
PEG14	33 kD 1804	5	2,9
PEG2+14 (ESP19)	33 kD en 491/1804, Di	21	12

15 ESTUDIO DE PK EN CONEJO. Para entender los efectos de la PEGilación en la farmacocinética (PK) de FVIII, se llevaron a cabo estudios de PK en varias especies. Se utilizaron conejos NZW SPF para el estudio: 10 hembras, 5 conejos por grupo, 2 grupos (FVIII PEG2 y PEG2 PEGilado con 22 kD). Las muestras se diluyeron en PBS estéril con una concentración final de 100 UI/ml (unidades cromogénicas). Cada conejo recibió una dosis de 1 ml/kg (100 UI/kg) de la sustancia de ensayo o el control diluidos por la vena marginal de la oreja. En varios tiempos post-inyección, se extrajeron muestras de sangre (1 ml) en una jeringa de 1 ml (cargada con 100 µl de Citrato Na al 3,8 %) de la arteria central de la oreja en puntos de tiempo definidos tras la dosificación. Las muestras de plasma se incubaron con un revestimiento de anticuerpo R8B12 de la cadena pesada en una placa de 96 pocillos para capturar específicamente el FVIII humano dosificado. La actividad del FVIII capturado se determinó por el ensayo cromogénico (Figura 17). El PEG2 PEGilado y PEG6 PEGilado también se compararon con BDD (Figuras 18 y 19), mostrando las mteínas PEGiladas una mejora en la recuperación del plasma en comparación con BDD. El FVIII tipo silvestre de longitud completa PEGilado no parece mostrar mucha mejoría (Figura 20).

25 ESTUDIO DE PK EN RATÓN. Como una segunda especie, se utilizaron ratones con ICR normal o hemofílicos, deficientes de FVIII (Taconic, Hudson, NY) en los estudios de PK. Los ratones normales se utilizaron para el estudio, 5 ratones por grupo por punto de tiempo. Los materiales de ensayo se diluyeron en el tampón de formulación con una concentración nominal final de 25 UI/ml. Cada ratón se puede administrar a 4 ml/kg (~ 0,1 ml de volumen total) del material de ensayo diluido por la vena caudal. Las muestras de sangre (0,45 o 0,3 ml para el estudio en ratón normal o hemofílico, respectivamente) se extrajeron en una jeringa de 1 ml (cargada con 50 o 30 µl de Citrato Na al 3,8 % para el estudio con ratón normal o hemofílico, respectivamente) de la vena cava inferior en el punto de tiempo indicado (un animal por muestra). Las muestras de plasma se ensayaron en cuanto a la concentración de FVIII utilizando el procedimiento del ensayo cromogénico que se ha descrito anteriormente. El PEG6 PEGilado presentaba una recuperación del plasma mayor en comparación con la de BDD o PEG6 (Figura 21). El PEG2 PEGilado muestra una recuperación del plasma mayor en comparación con BDD (Figuras 22 y 23).

35

Tabla 6. Sumario del estudio PK de FVIII PEGilado que muestra las semividas en horas. *La prep. inicial de PEG6 PEGilado con 33 kD con semivida de 9,6 h en conejos no era tan pura como la última prep. que rendía 17,4 h.

Construcción	Semivida, h	Especies
BDD	6,6	Conejo normal
PEG2	4,8	Conejo normal
PEG2-22 kD PEG	7,5	Conejo normal
PEG2-43 kD PEG	8,0	Conejo normal
PEG6-12 kD PEG	8,2	Conejo normal
PEG6-33 kD PEG*	9,6	Conejo normal
PEG6-33 kD PEG	17,4	Conejo normal
BDD	4,5	Ratón normal
PEG2-22 kD PEG	7,3	Ratón normal
PEG6-12 kD	5,3	Ratón normal
PEG14-33 kD PEG	7,3	Ratón normal
PEG14-12 kD PEG	5,5	Ratón normal
PEG22-64 kD	9,2	Ratón normal

5 Tabla 7. Recuperación en plasma de muteínas PEG PEGiladas en ratones hemofílicos. Se presentan las veces de mejoría en la recuperación en plasma a las 16 horas post-inyección en comparación con BDD de control llevado a cabo la misma fecha

Muteína	PEG	Veces
PEG 6	12 kD	2,9
PEG 6	33 kD	2,9
PEG 2+6	33 kD	3,3
PEG 14	33 kD	2,5
PEG 2+6	33 kD	4,4
PEG 2+14	33 kD	2,1
PEG22	64 kD	3,2

10 RECUPERACIÓN DEL FACTOR VIII (BDD) EN RATÓN HEMOFÍLICO. El histograma de la recuperación del Factor VIII (BDD) en ratón hemofílico que se muestra en la Figura 24 representa una evaluación farmacocinética (PK) de la semivida de dos especies de BDD del Factor VIII en un ensayo con ratón hemofílico. Este ensayo se diseñó para medir las concentraciones en plasma de ambos BDD del Factor VIII (al que se hace referencia en la Figura 24 como "ts" o BDD de Factor VIII tipo silvestre) y la variante PEG2+6 PEGilada doblemente del BDD del Factor VIII (e identificado en otros sitios del presente documento como variante doble del BDD del Factor VIII L491C, K1808C) en tres puntos de tiempo tras la administración intravenosa en un modelo de ratón. Aunque las evaluaciones PK de los puntos de tiempo 0,8 y 4 horas eran comparables, la evaluación de las 16 horas es particularmente destacable. A las 16 horas, permanecían aproximadamente cuatro veces (400 %) como mucho de la variante doblemente PEGilada de BDD de Factor VIII (PEG2+6) en el plasma del ratón 16 horas tras la administración en comparación con la molécula no PEGilada.

20 MODELO DE LACERACIÓN RENAL. Para determinar si las muteínas de FVIII PEGilado eran eficaces en detener el sangrado en un ratón hemofílico, se empleó el modelo de laceración renal. Los ratones hemofílicos (C57/BL6 con un gen FVIII alterado) se anestesiaron con isofluorano y se pesaron. Se expuso la vena cava posterior y se inyectaron 100 ul de solución salina o FVIII utilizando una aguja de calibre 31. La aguja se retiró con cuidado y se aplicó presión en el sitio de la inyección durante 30-45 segundos para evitar el sangrado. Tras dos minutos se expuso el riñón y se mantuvo entre los fórceps a lo largo del eje vertical. Utilizando un bisturí del nº 15, se cortó el riñón horizontalmente con una profundidad de 3 mm. Para asegurar una profundidad uniforme de la lesión el riñón se dejó ligeramente en el medio para exponer el mismo tejido en cada lado del fórceps. La superficie del riñón expuesta se cortó hasta la profundidad del fórceps. Se cuantificó la pérdida de sangre como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron diferentes dosis de FVIII en ratones para caracterizar la relación dosis respuesta de FVIII sobre el sangrado renal. El PEG2 PEGilado muestra una potencia comparable a BDD en la reducción de la pérdida de sangre tras la lesión renal en el ratón (Figura 25). Por lo tanto, aunque la actividad de coagulación del PEG2 PEGilado es menor que la del BDD, este modelo de laceración renal muestra que la eficacia in vivo del PEG2 PEGilado no estaba reducida mediblemente en comparación con BDD, lo que es consistente con los datos del

ensayo cromogénico.

ENSAYO DE INHIBICIÓN POR ANTICUERPOS. Añadiendo un polímero de alto peso molecular tal como el polietilenglicol (PEG) específicamente en la posición 491 (es decir, PEG2) se debería reducir la unión y sensibilidad por el mAb 413, y por extensión a una gran proporción de anticuerpos inhibidores del paciente ya que muchos pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores contra el mismo epítipo de mAb 413. Para ensayar esto, se incubaron cantidades crecientes del mAb 413 con cantidades no saturantes (0,003 UI/ml) de BDD o PEG2 PEGilado con 43 kD y se ensayaron en cuanto a la actividad funcional en un ensayo cromogénico (Figura 26). Se utilizaron el R8B12, un anticuerpo no inhibidor y el ESH4 un anticuerpo inhibidor que se dirige al dominio C2 como controles. El PEG2 PEGilado además es más resistente a la inhibición por el mAb 413 que el BDD y muestra un patrón de inhibición similar en presencia de los anticuerpos de control que no se unen cerca de la posición 491. Además, el efecto protector del PEG contra la inhibición del mAb 413 depende del tamaño del PEG, teniendo los PEG mayores un mayor efecto (Figura 27). Para ensayar si el FVIII PEGilado es más resistente a los anticuerpos inhibidores de los pacientes, se midió la actividad cromogénica en presencia de un panel de plasma derivado de pacientes con hemofilia A que habían desarrollado inhibidores del FVIII. De los 8 plasmas de pacientes ensayados, el PEG2 PEGilado con 43 kD era más resistente a la inhibición por el plasma de pacientes que el BDD en 4 muestras de plasma de pacientes. Por ejemplo, el PEG2, PEG6, o PEG2+6 PEGilados presentaban una actividad residual mayor que el BDD en el plasma de un paciente pero no en otro plasma (Figura 28). El PEG2+6 diPEGilado parece ser más resistente que el PEG2 o PEG6 monoPEGilados. Estos resultados sugieren que las muteínas PEG PEGiladas pueden ser más eficaces en el tratamiento de pacientes que desarrollan inhibidores del FVIII.

EXPLORACIÓN DE PEGILACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO. La eficacia de PEGilación de una muteína PEG en particular es impredecible, especialmente porque no hay una información estructural directa de BDD. Por ejemplo, basándose en el modelo de estructura de BDD, se podría predecir que la eficacia de PEGilación de PEG4 y PEG5 debería ser alta, similar a la del PEG2 y PEG15 ya que las tres posiciones están expuestas en la superficie y apuntan hacia afuera de acuerdo con la estructura. Por lo tanto, para utilizar PEG para buscar nuevos mecanismos de aclaramiento mediante la PEGilación sistémica necesitará que se explore una gran cantidad de muteínas.

Para explorar rápidamente un gran número de muteínas PEG, se ha desarrollado un nuevo procedimiento de alto rendimiento que puede ensayar la eficacia de PEGilación y la actividad funcional de productos PEGilados a partir de muteínas transfectadas transitoriamente. Tan poco como 5-10 ml de muteínas de PEG expresadas transitoriamente con un valor cromogénico de FVIII tan bajo como 0,1-0,2 UI/ml se concentra aproximadamente 50 veces utilizando un dispositivo Amicon-centra Ultra MWCO 30K de manera que la concentración de FVIII alcanza por encima de 1 nM, cerca del intervalo de afinidad de la interacción del anticuerpo contra FVIII. La muteína de PEG concentrada (~300 ul) se incubaba con ~30 ul de resina de anticuerpo C7F7 de FVIII durante una noche a 4 °C, se lava, eluye, dializa y reduce. El reductor se elimina y las muteínas de PEG reducidas se PEGilan y se procesan en un análisis de Western como se ha descrito anteriormente (Figuras 29 y 30). En respecto a la eficacia de PEGilación de las muteínas de PEG expresadas transitoriamente coincide exactamente con la de las muteínas de PEG purificadas.

Se pueden explorar docenas de muteínas de PEG por este procedimiento en uno o dos meses. Por ejemplo, el PEG14 (BDD K1804C) tenía al menos aproximadamente un 80 % de PEGilación de la cadena ligera con un PEG de 12 kD y no PEGilación de la cadena pesada (datos no mostrados), coincidiendo con la mutación K1804C localizada en la cadena ligera. La distancia C a C entre K1804 y K1808 (posición de PEG6) es solo de 8,4 amstrongs basándose en la estructura de BDD, sugiriendo que la introducción de un PEG de 43 kD en esta posición tiene una mejora similar en la PK que el PEG6 PEGilado de 33 kD, con la ventaja de tener un rendimiento de PEGilación mucho mayor. El rendimiento de PEGilación relativo para todas las muteínas de PEG ensayados se resumen en la Tabla 8. La PEG ilación era altamente selectiva para la cadena de FVIII particular en la que se introducía la mutación de cisteína, en cada muteína con la cisteína en la cadena pesada solamente se PEGilaba la cadena pesada mientras que cada muteína con la cisteína en la cadena ligera se PEGilaba en la cadena ligera. Las muteínas número 2 a 31 representan las mutaciones de cisteínas de BDD que sustituían el aminoácido nativo en la posición enumerada con una cisteína. El PEG2+6 es una doble muteína de BDD donde la posición 491 y 1808 se sustituían con cisteínas. A1 y A2 (y el dominio B para KG-2, el FVIII de longitud completa) pertenecen a la cadena pesada mientras que A3, C1 y C2 pertenecen a la cadena ligera. La eficacia de PEGilación se estimó de los productos PEGilados procesados en una SDS-PAGE comparando las intensidades de la banda PEGilada con la banda no PEGilada: +++ ~ 80 % de rendimiento de PEGilación, ++ ~ 30-70 % de rendimiento, + ~ 10-30 % de rendimiento, y - ~ <10 % de rendimiento.

Tabla 8. Eficacia de PEGilación para distintos FVIII PEGilados

Muteína de PEG	Posición	Dominio	H-PEG	L-PEG
2	491	A2	+++	-
4	504	A2	+	-
5	468	A2	+	-
6	1808	A3	-	++

(continuación)

Muteína de PEG	Posición	Dominio	H-PEG	L-PEG
7	1810	A3	-	++
8	1812	A3	-	-
9	1815	A3	-	-
11	1795	A3	-	+
12	1796	A3	-	+
13	1803	A3	-	++
14	1804	A3	-	+++
15	377	A2	+++	-
16	378	A2	+++	-
17	556	A2	++	-
20	2118	A3	-	+
21	81	A1	++	-
22	129	A1	++	-
23	422	A2	-	-
25	570	A2	-	-
26	1864	A3	-	++
27	1911	A3	-	+++
28	2091	C1	-	++
29	2284	C2	-	+
30	711	A2	+	-
31	1903	A3	-	++
2+6	490/1808	A2/A3	+++	++
2+14	490/1804	A2/A3	+++	+++
KG-2		B	+++	-

ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE MUTEÍNAS DE PEG REDUCIDAS. Para determinar la identidad de la "protección" que previene la PEGilación directa de las muteínas de PEG o el FVIII de longitud completa, se redujo el PEG2+14 con TCEP a concentraciones que variaban de 67 μ M a 670 μ M. El rendimiento de PEGilación aumentaba en proporción a cantidades crecientes de TCEP (Figura 31). Las mismas muestras se analizaron también por espectrometría de masas antes de la PEGilación (Figura 32). Con el fin de tener un dominio proteico que se pudiera estudiar directamente, las muestras se digirieron con trombina con una relación de 20 unidades/mg de FVIII durante 30 minutos a 37 °C. La escisión por trombina produce un fragmento A2 que incluye los restos 372 a 740 y sin sitios de glicosilación ocupados. La muestra digerida se inyectó en un sistema de cromatografía líquida de fase inversa C4 y el eluyente de la columna se introdujo directamente en el espectrómetro de masas con cuádruple tiempo de vuelo mediante una interfaz de electrospray. El espectro de masas desde debajo del pico cromatográfico correspondiente con el dominio A2 se desarrolló para proporcionar un valor de masa proteica intacta. Antes de la reducción, el dominio A2 de PEG2+14 da lugar a un peso que es 118 daltons mayor que el previsto teóricamente. Según se aumenta la concentración del TCEP, aparece un nuevo pico que tiene el peso previsto del dominio A2. La proporción de este nuevo pico aumenta según aumenta la concentración de TCEP. La diferencia de 118 daltons se puede tomar en cuenta como cisteinilación en el resto Cys 491 mediante la formación de disulfuro con una cisteína (119 Da) y precisión del instrumento. Por lo tanto esto demuestra que las muteínas de PEG están protegidas por una cisteína, que evita la PEGilación directa.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Clark, Pan
- <120> Modificación de FVIII dirigida al sitio
- <130> US 07430-00236
- <150> US 60/627277
- <151> 12-11-2004
- <160> 35

ES 2 633 916 T3

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

ES 2 633 916 T3

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540

ES 2 633 916 T3

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu

ES 2 633 916 T3

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1055 1060 1065
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080
 Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1085 1090 1095
 Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
 1100 1105 1110
 Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
 1115 1120 1125
 Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
 1130 1135 1140
 Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
 1145 1150 1155
 Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 1160 1165 1170
 Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
 1175 1180 1185
 Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
 1190 1195 1200
 Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 1205 1210 1215
 Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
 1220 1225 1230
 Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
 1235 1240 1245
 Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
 1250 1255 1260
 Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1265 1270 1275

ES 2 633 916 T3

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
 1280 1285 1290

Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
 1295 1300 1305

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
 1310 1315 1320

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
 1325 1330 1335

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
 1340 1345 1350

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
 1355 1360 1365

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
 1370 1375 1380

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
 1385 1390 1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
 1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
 1415 1420 1425

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
 1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1445 1450 1455

<210> 4
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<220>
 <223> Secuencia del factor VIII humano

<400> 4

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

ES 2 633 916 T3

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 Asp 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

ES 2 633 916 T3

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

ES 2 633 916 T3

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

ES 2 633 916 T3

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		
1010						1015					1020					

ES 2 633 916 T3

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

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
 1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
 1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
 1175 1180 1185

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

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

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

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

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

ES 2 633 916 T3

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
 1265 1270 1275
 Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
 1280 1285 1290
 Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr
 1295 1300 1305
 Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu
 1310 1315 1320
 Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr
 1325 1330 1335
 Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
 1340 1345 1350
 Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
 1355 1360 1365
 Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala
 1370 1375 1380
 Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
 1385 1390 1395
 Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
 1400 1405 1410
 Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
 1415 1420 1425
 Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu
 1430 1435 1440
 Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
 1445 1450 1455
 Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
 1460 1465 1470
 Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
 1475 1480 1485
 Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys

ES 2 633 916 T3

1490						1495						1500			
Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Leu	
1505						1510					1515				
Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile	
1520						1525					1530				
Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Phe	Leu	Arg	
1535						1540					1545				
Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser	Lys	Leu	Leu	Asp	
1550						1555					1560				
Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln	Ile	Pro	Lys	Glu	
1565						1570					1575				
Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Ala	Phe	Lys	
1580						1585					1590				
Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys	Glu	Ser	Asn	His	
1595						1600					1605				
Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu	
1610						1615					1620				
Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	Gln	
1625						1630					1635				
Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	
1640						1645					1650				
Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	
1655						1660					1665				
Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	
1670						1675					1680				
Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	
1685						1690					1695				
Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	
1700						1705					1710				
Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	
1715						1720					1725				

ES 2 633 916 T3

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

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

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
 1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
 1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
 1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
 1820 1825 1830

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
 1835 1840 1845

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
 1850 1855 1860

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
 1865 1870 1875

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
 1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
 1910 1915 1920

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

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

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

ES 2 633 916 T3

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

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

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
 2000 2005 2010

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
 2015 2020 2025

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
 2030 2035 2040

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
 2045 2050 2055

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
 2060 2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
 2075 2080 2085

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
 2090 2095 2100

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Leu Tyr
 2330

5 <210> 5
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PEG1 usado para mutagénesis

<400> 5
 gatgtccgtc cttgtgctc aaggagatta cca 33

15 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PEG2 usado para mutagénesis

<400> 6
 ttgtattcaa ggagatgccc aaaagggtga aaac 34

25 <210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>

ES 2 633 916 T3

<223> Cebador PEG3 usado para mutagénesis

<400> 7
ttacaaaag gtgtatgccca ttgaaggat ttc 34

5

<210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador PEG4 usado para mutagénesis

<400> 8
aaggatttc caattgcc aggagaaata ttc 33

15

<210> 9
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador PEG 5 usado para mutagénesis

<400> 9
gattatatt aagaattgcg caagcagacc atat 34

25

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador PEG6 usado para mutagénesis

35

<400> 10
tagaaaaaac ttgtctgcc ctaatgaaac caaac 36

40

<210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45

<220>
<223> Cebador PEG7 usado para mutagénesis

<400> 11
aactttgtca agccttgca aacaaaact tac 33

50

<210> 12
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55

<220>
<223> Cebador PEG8 usado para mutagénesis

<400> 12
gtcaagccta atgaatgcaa aacttacttt tgga 34

60

<210> 13
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65

<220>

ES 2 633 916 T3

<223> PEG9 Cebador usado para mutagénesis

5 <400> 13
caagcctaata gaaactgca cttacttttg gaaag 35

<210> 14
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador PEG10 usado para mutagénesis

15 <400> 14
ctaataaag caaaactgca ttttgaaag tgcaac 36

<210> 15
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador PEG11 usado para mutagénesis

25 <400> 15
atttctatg aggaatgcca gaggcaagga gca 33

30 <210> 16
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Cebador PEG12 usado para mutagénesis

40 <400> 16
tcttatgagg aagattgca gcaaggagca gaa 33

<210> 17
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Cebador PEG13 usado para mutagénesis

50 <400> 17
caaggagcag aacctgcaa aaactttgca aagcct 36

<210> 18
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Cebador PEG14 usado para mutagénesis

60 <400> 18
ggagcagaac ctagatgcaa ctttgcaag cct 33

<210> 19
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 633 916 T3

<223> Cebador PEG15 usado para mutagénesis

<400> 19
cgctcagttg ccaagtgta tcctaaaact tgg 33

5

<210> 20
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador PEG16 usado para mutagénesis

<400> 20
tcagttgcca agaagtgcc taaaactgg gta 33

15

<210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador PEG17 usado para mutagénesis

<400> 21
ctcctcatct gctactgca atctgtagat caa 33

25

<210> 22
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador PEG18 usado para mutagénesis

35

<400> 22
caaaatctt tccattctgc acctcagtcg tgtac 35
<210> 23

40

<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador PEG19 usado para mutagénesis

45

<400> 23
gtcaatgggt atgtatgcag gtctctgcca ggt 33

50

<210> 24
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55

<220>
<223> Cebador PEG20 usado para mutagénesis

<400> 24
cagactatc gaggatgttc cactggaacc tta 33

60

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

65

<220>

ES 2 633 916 T3

<223> Cebador PEG21 usado para mutagénesis

<400> 25
atccaggctg aggtttgtga tacagtggtc att 33

5

<210> 26
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador PEG22 usado para mutagénesis

<400> 26
gaagtgata aagtctgtcc tggggaagc cat 33

15

<210> 27
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador PEG23 usado para mutagénesis

<400> 27
cagcggattg gtagtgta caaaaaagtc cga 33

25

<210> 28
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador PEG24 usado para mutagénesis

<400> 28
gaagatgggc caactgtctc agatcctcgg tgc 33

35

<210> 29
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Cebador PEG25 usado para mutagénesis

<400> 29
cagataatgt cagactgcag gaatgtcatc ctg 33

45

<210> 30
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<223> Cebador PEG26 usado para mutagénesis

<400> 30
cacactaaca cactgtgtcc tgctcatggg aga 33

55

<210> 31
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60

<220>

65

ES 2 633 916 T3

<223> Cebador PEG27 usado para mutagénesis

<400> 31
cagatggaag atccctgctt taaagagaat tat 33

5

<210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador PEG28 usado para mutagénesis

<400> 32
accaggggtg cccgttgcaa gttctccagc ctc 33

15

<210> 33
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador PEG29 usado para mutagénesis

<400> 33
aaagtaaagg tttttgcgg aaatcaagac tcc 33

25

<210> 34
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador PEG30 usado para mutagénesis

35

<400> 34
ttgcagttgt cagttgctt gcatgaggtg gca 33

40

<210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45

<220>
<223> Cebador PEG31 usado para mutagénesis

<400> 35
aatatgaaa gaaacgctag ggctccctgc aat 33

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que tiene actividad procoagulante del factor VIII que comprende un factor VIII polipeptídico funcional que está mutado de manera que al menos un resto no cisteína se ha remplazado con un resto de cisteína de manera que existe un resto de cisteína mutante, en el que el factor VIII polipeptídico funcional está unido covalentemente a un polímero biocompatible en el resto de cisteína mutante, en el que el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en uno de los aminoácidos del factor VIII de las posiciones 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1864, 1911, 2091, 2118 y 2284.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero biocompatible es el polietilenglicol.
3. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el factor VIII polipeptídico funcional es un factor VIII con el dominio B eliminado.
4. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el polímero biocompatible está unido covalentemente al factor VIII con el dominio B eliminado en uno de los aminoácidos de las posiciones 129, 491, 1804, o 1808; un polímero biocompatible está unido en el aminoácido de la posición 491 y un segundo polímero biocompatible está unido al aminoácido de la posición 1808; o un polímero biocompatible está unido al aminoácido de la posición 491 y un segundo polímero biocompatible está unido al aminoácido de la posición 1804.
5. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el factor VIII polipeptídico funcional tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 3.
6. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el factor VIII polipeptídico funcional tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y el polímero biocompatible es metoxipolietilenglicol.
7. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el polímero biocompatible se une al polipéptido en el aminoácido de la posición 1804.
8. Un procedimiento de preparación del conjugado de la reivindicación 1 que comprende:
- mutar una secuencia de nucleótidos que codifica el factor VIII polipeptídico funcional para sustituir una secuencia codificante de un resto no cisteína por una secuencia codificante de un resto de cisteína;
expresar la secuencia de nucleótidos mutada para producir una muteína con un aumento de cisteínas;
purificar la muteína;
hacer reaccionar la muteína con el polímero biocompatible, en el que el polímero biocompatible tiene un resto sulfhidrilo reactivo tal como un tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo o maleimida que reacciona con el polipéptido en el resto de cisteína introducido para formar el conjugado; y
purificar el conjugado.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el polímero biocompatible es metoxipolietilenglicol y la muteína reacciona con un grupo maleimida del metoxipolietilenglicol.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la expresión de la secuencia de nucleótidos mutada se produce en un medio de cultivo celular que comprende grupos sulfhidrilo que llegan a estar unidos covalentemente con el(los) grupo(s) libre(s) de la cisteína introducida en la muteína con aumento de cisteínas, comprendiendo además el procedimiento las siguientes etapas tras la expresión de la muteína y antes de purificar la muteína:
- (a) poner en contacto la muteína con un reductor en condiciones para reducir moderadamente la muteína y liberar el grupo sulfhidrilo; y
(b) eliminar el grupo sulfhidrilo liberado y el reductor de la muteína;
- además en el que la muteína se hace reaccionar con el polímero biocompatible al menos 5 minutos después de la eliminación del reductor.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la muteína del factor VIII es una muteína del factor VIII con el dominio B eliminado.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el polímero biocompatible es metoxipolietilenglicol-maleimida y tiene un intervalo de tamaño desde 5 kD a 64 kD.
13. Una composición farmacéutica para administración parenteral que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de una de las reivindicaciones 1-7 y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
14. El uso del conjugado de una de las reivindicaciones 1-7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia.

15. El uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia.

Mutagénesis y Sub-clonación de BDD-PegN

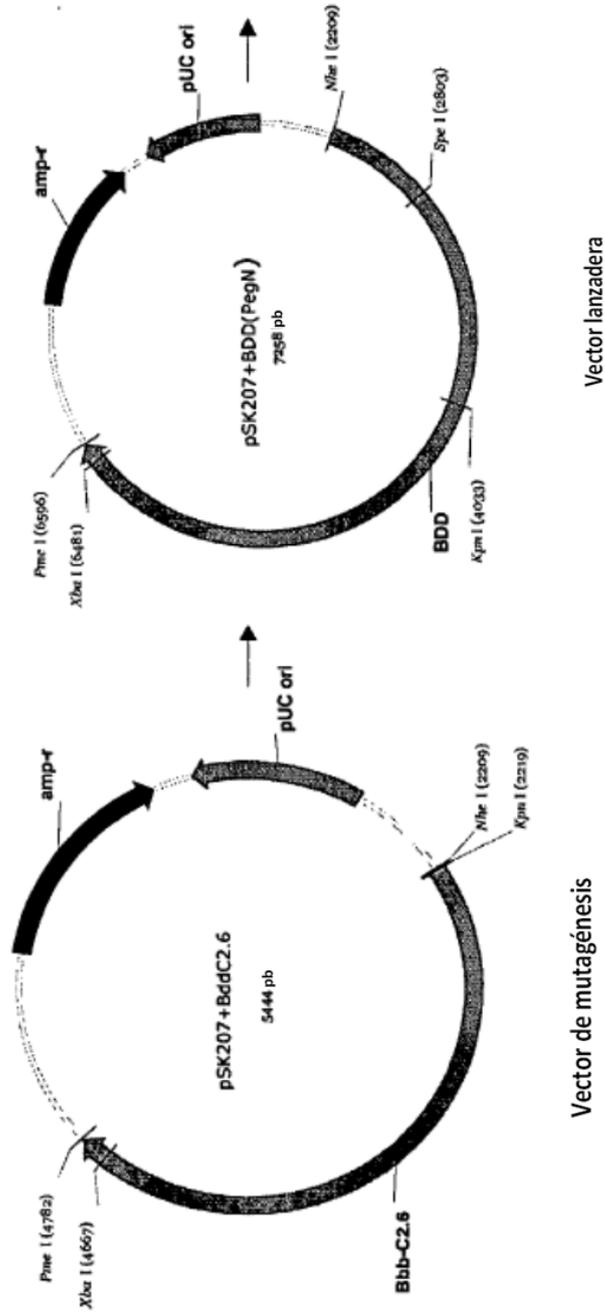
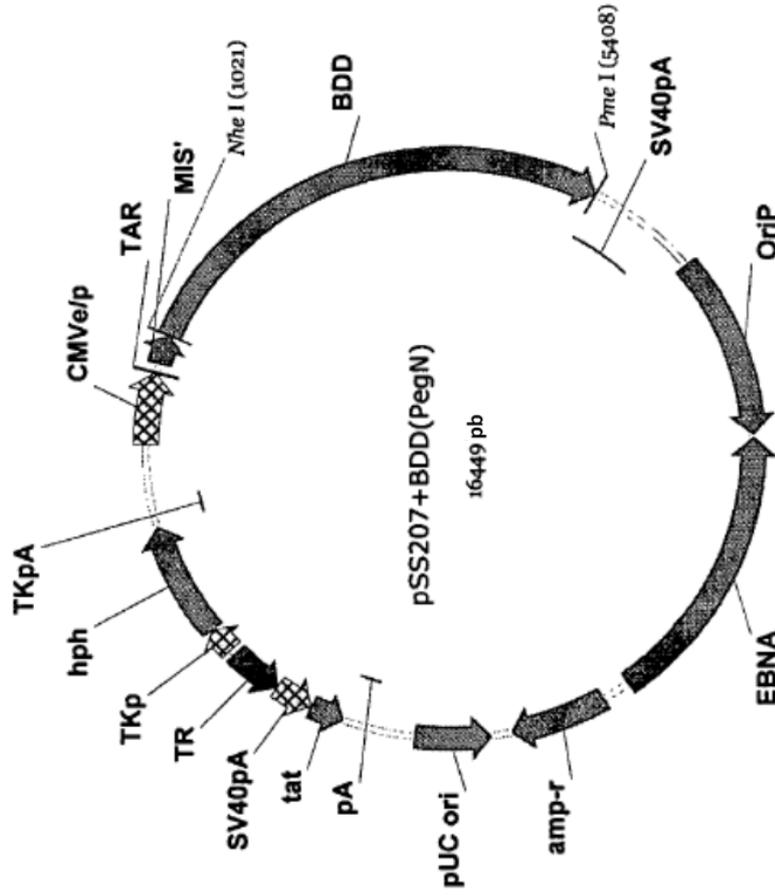


FIG. 1a

Mutagénesis y Sub-clonación de BDD-PegN



Vector de expresión

FIG. 1b

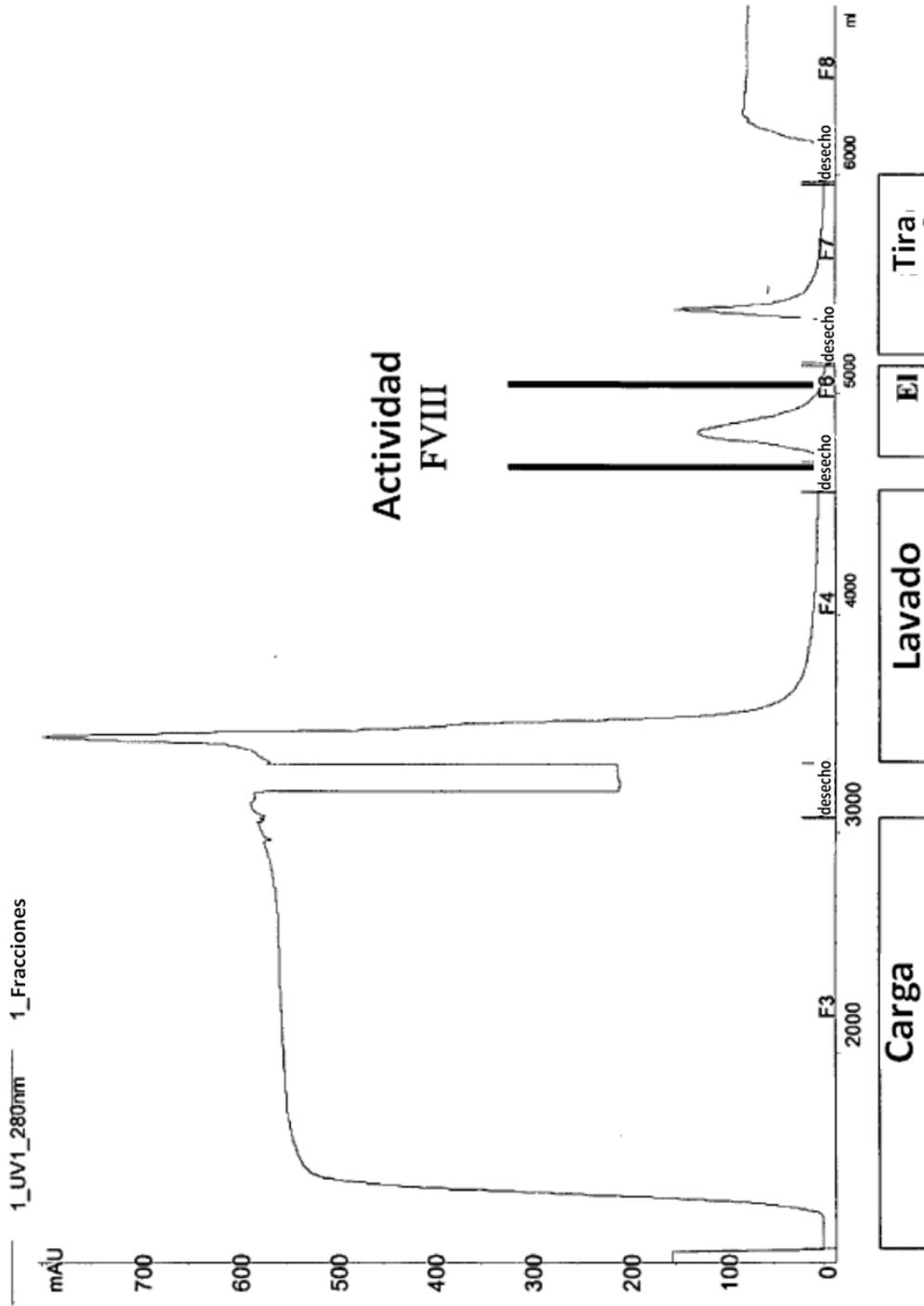


FIG. 2

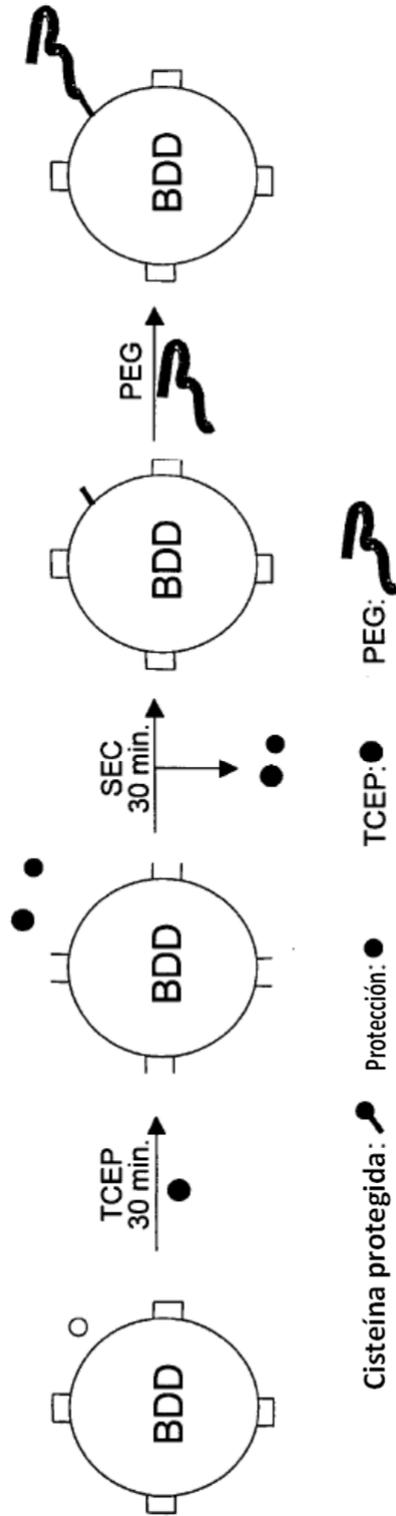


FIG. 3

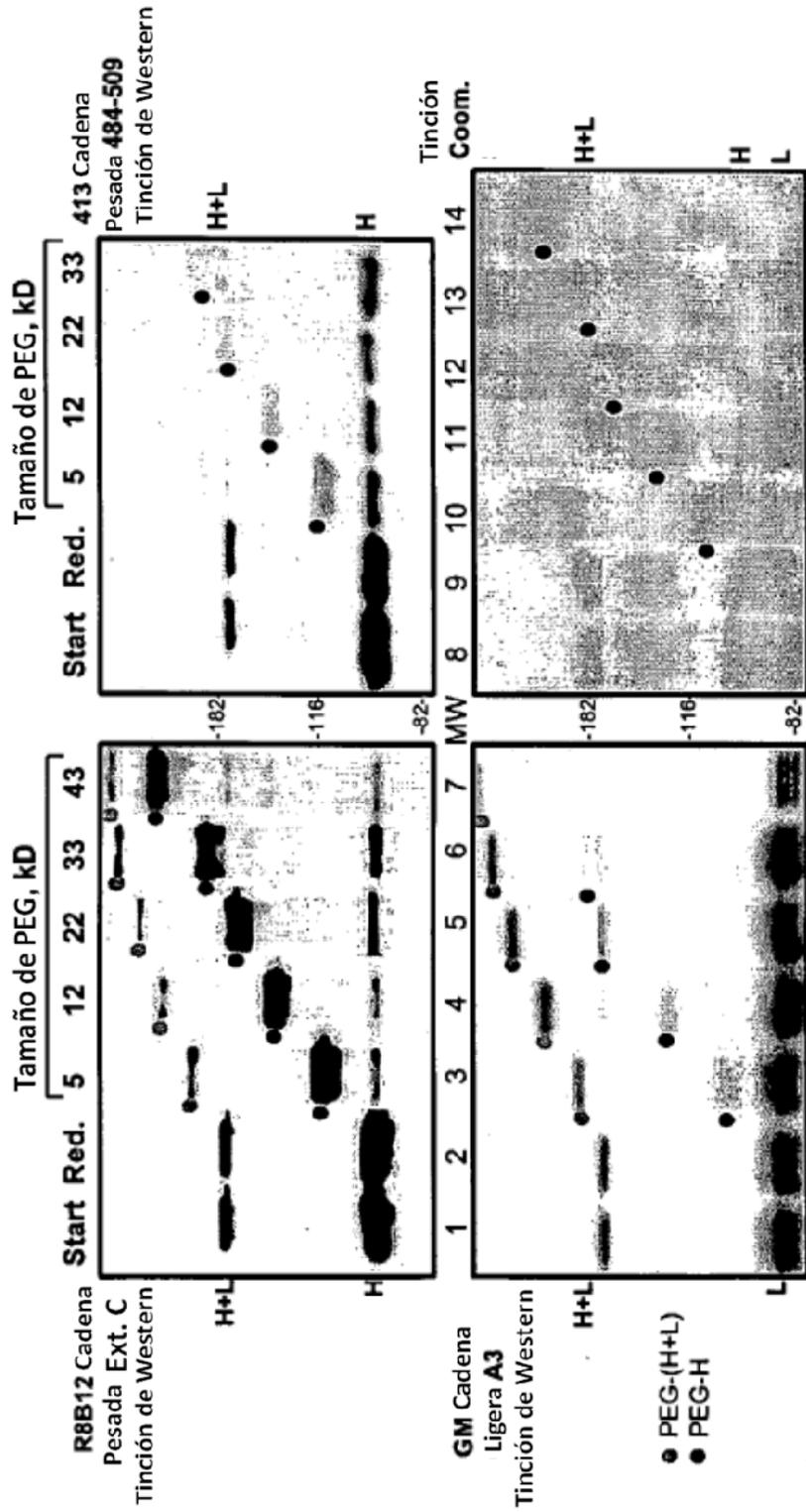


FIG. 4

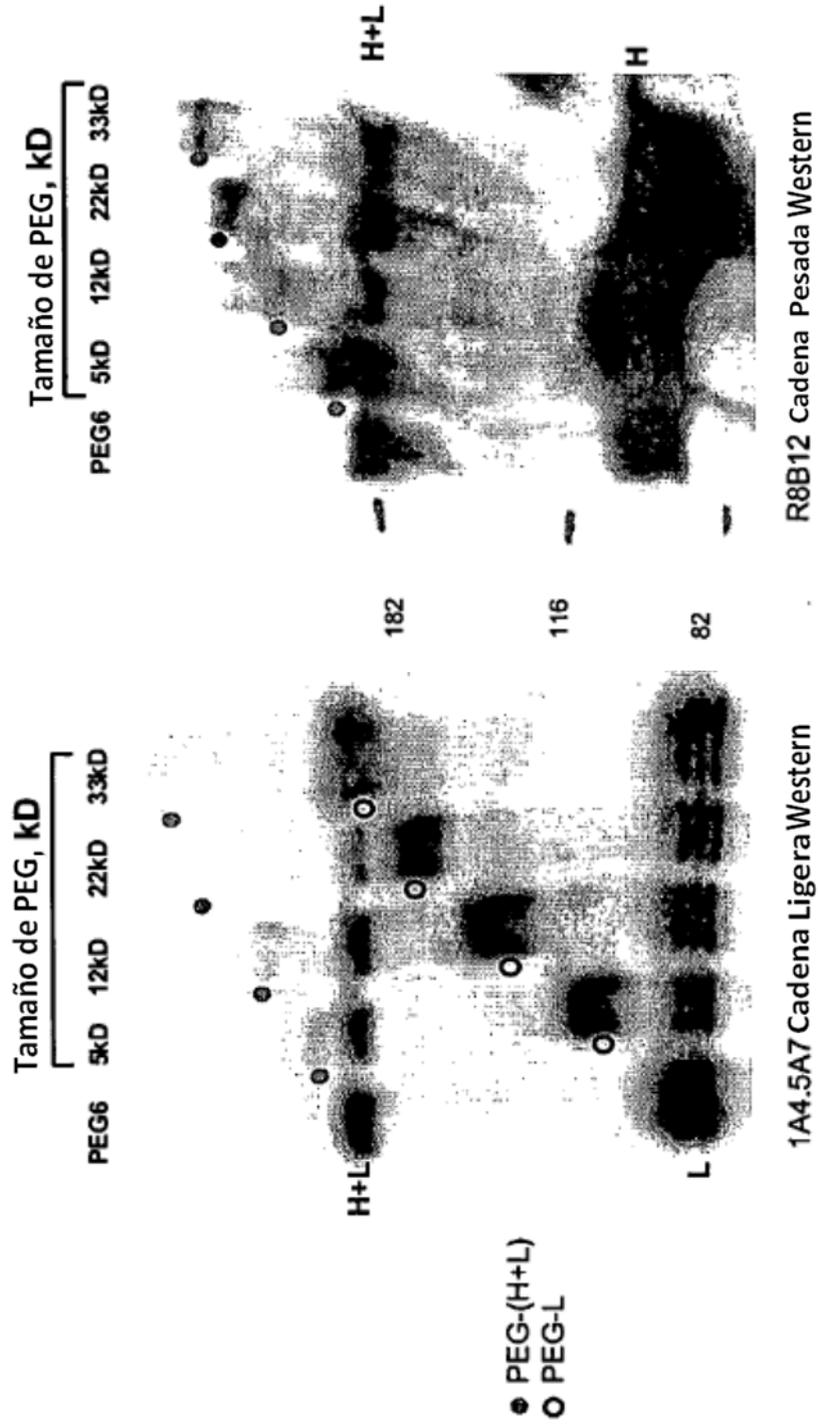


FIG. 5

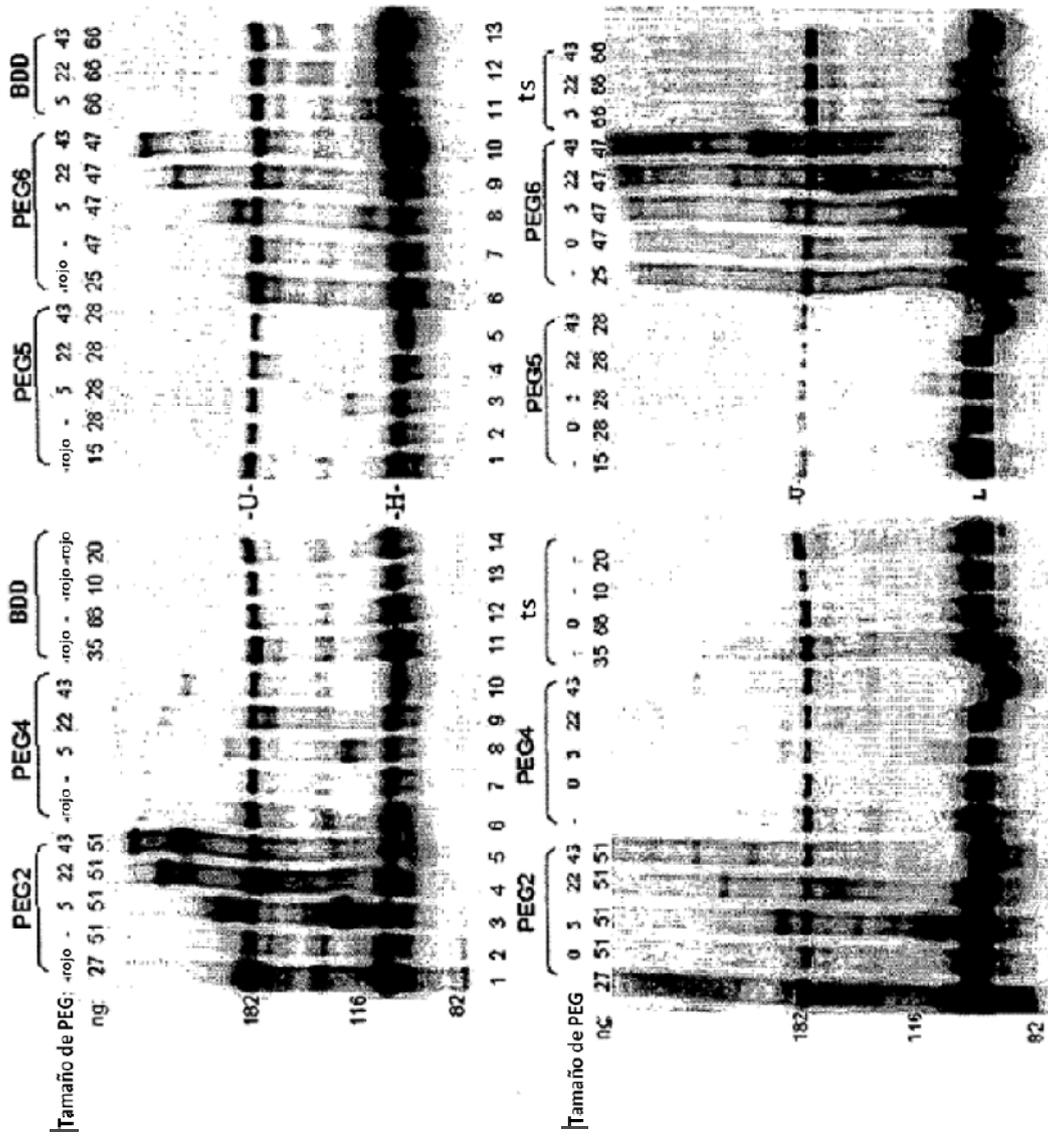


FIG. 6a

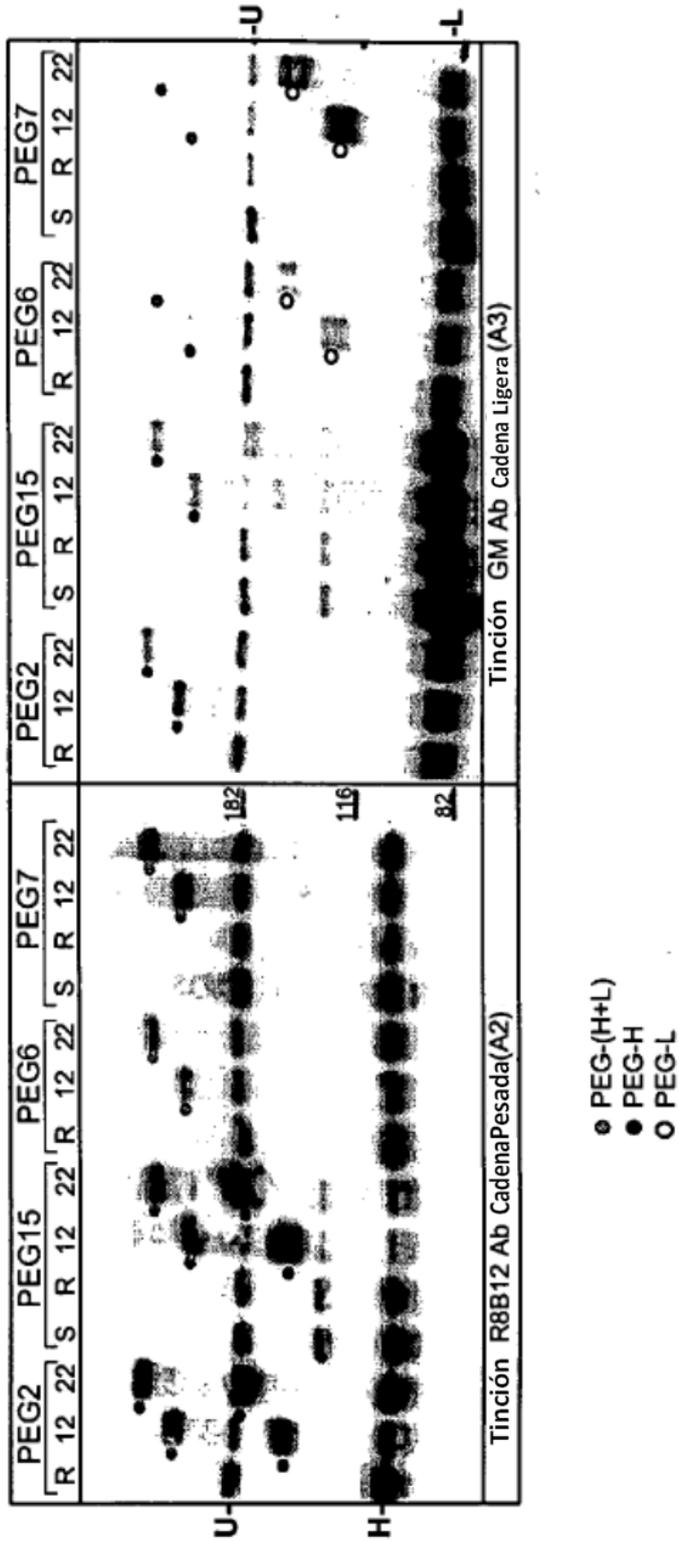


FIG. 6b

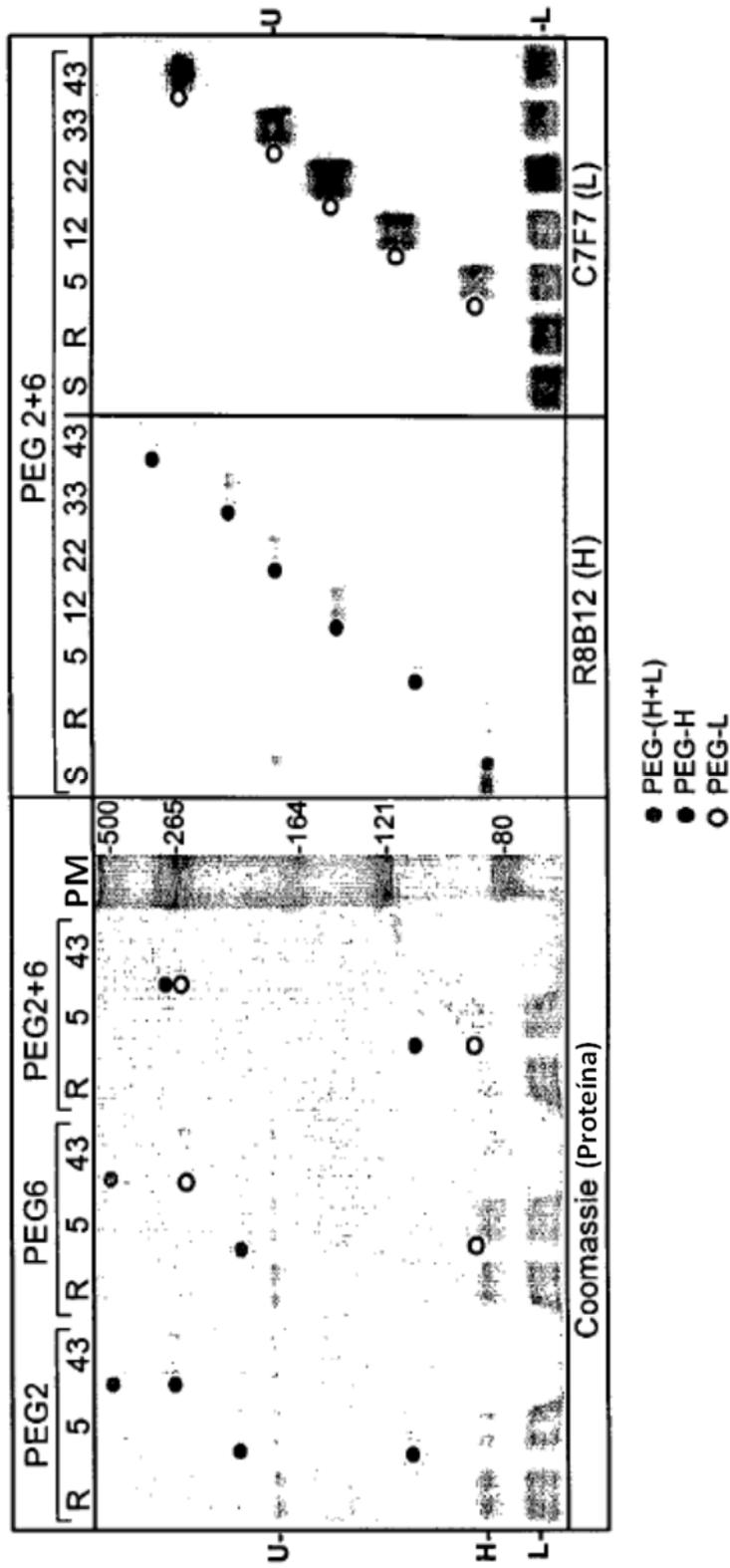


FIG. 6c

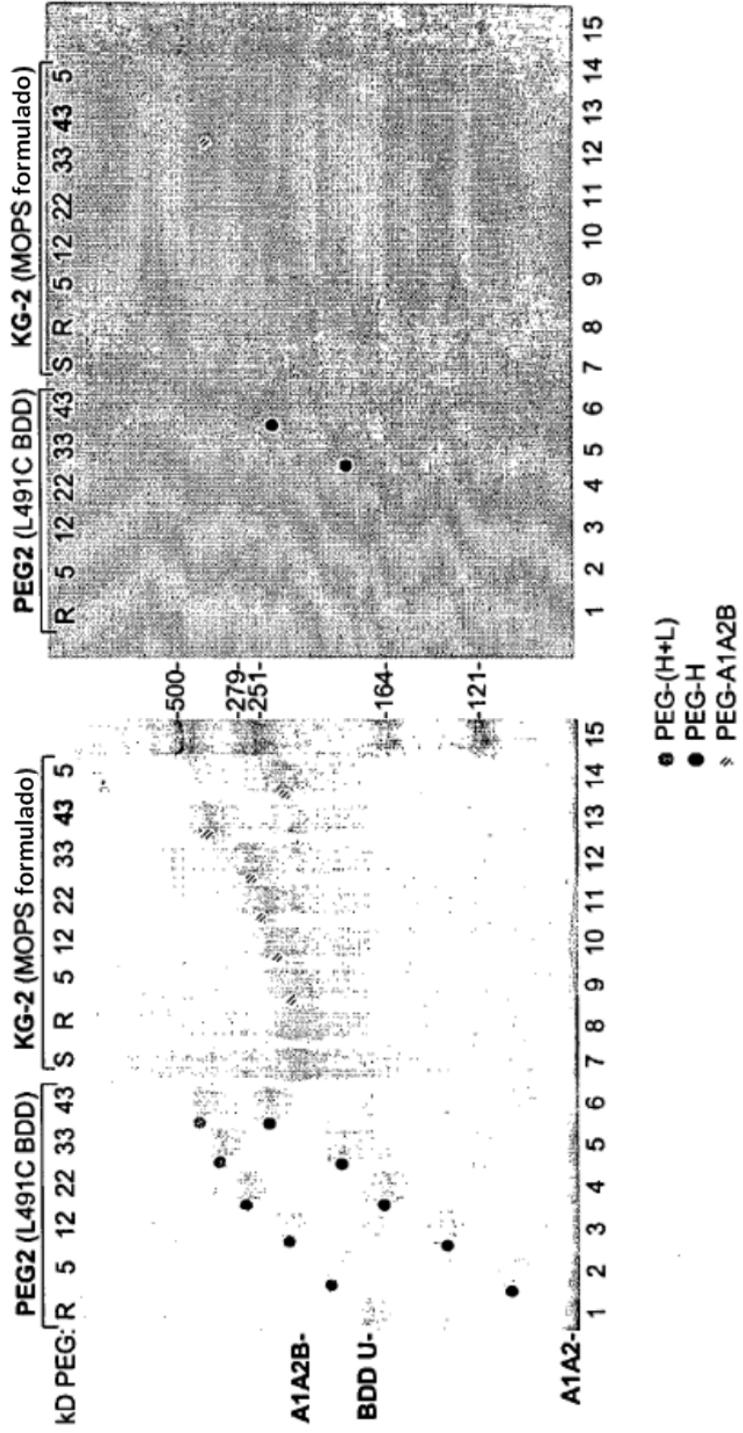


FIG. 6d

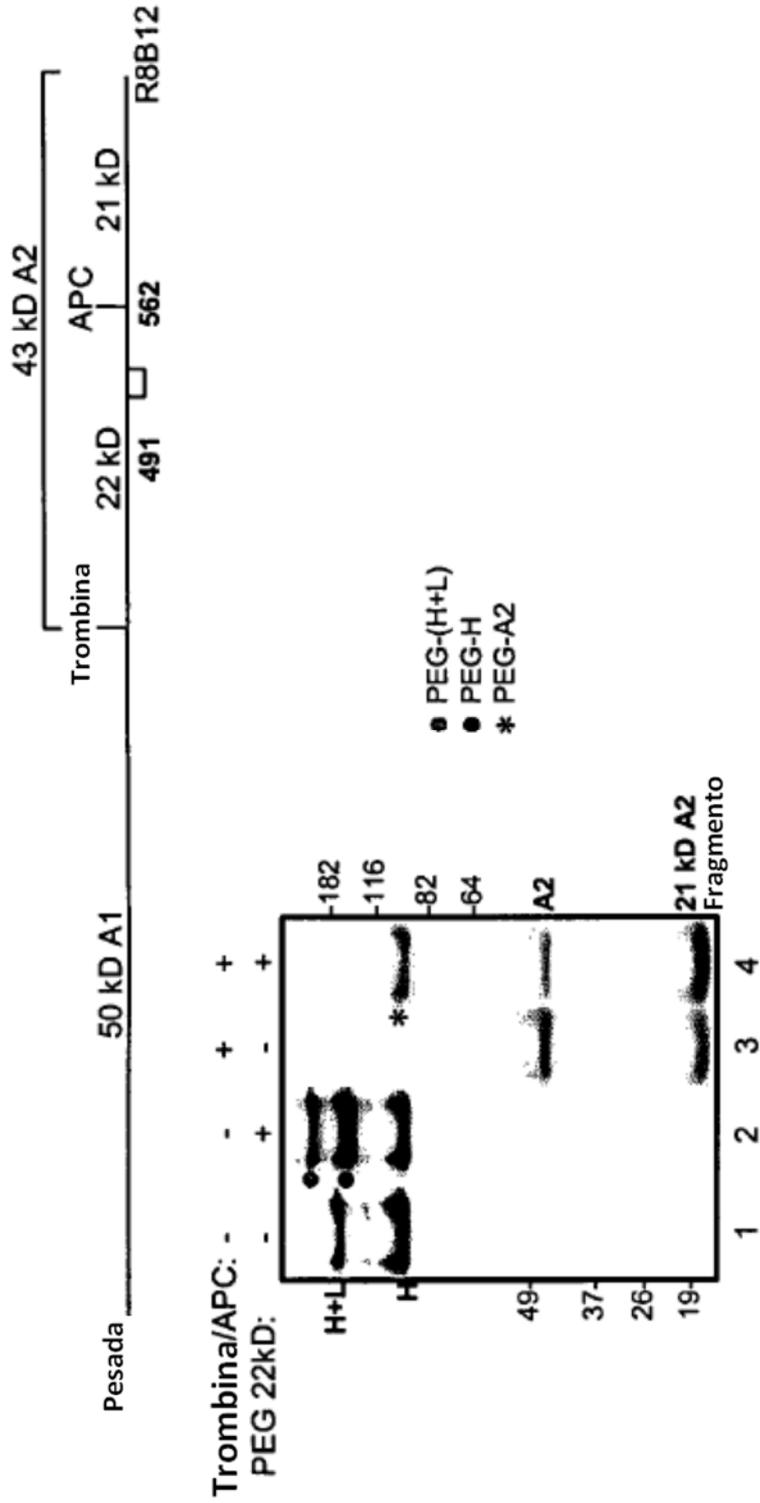


FIG. 7

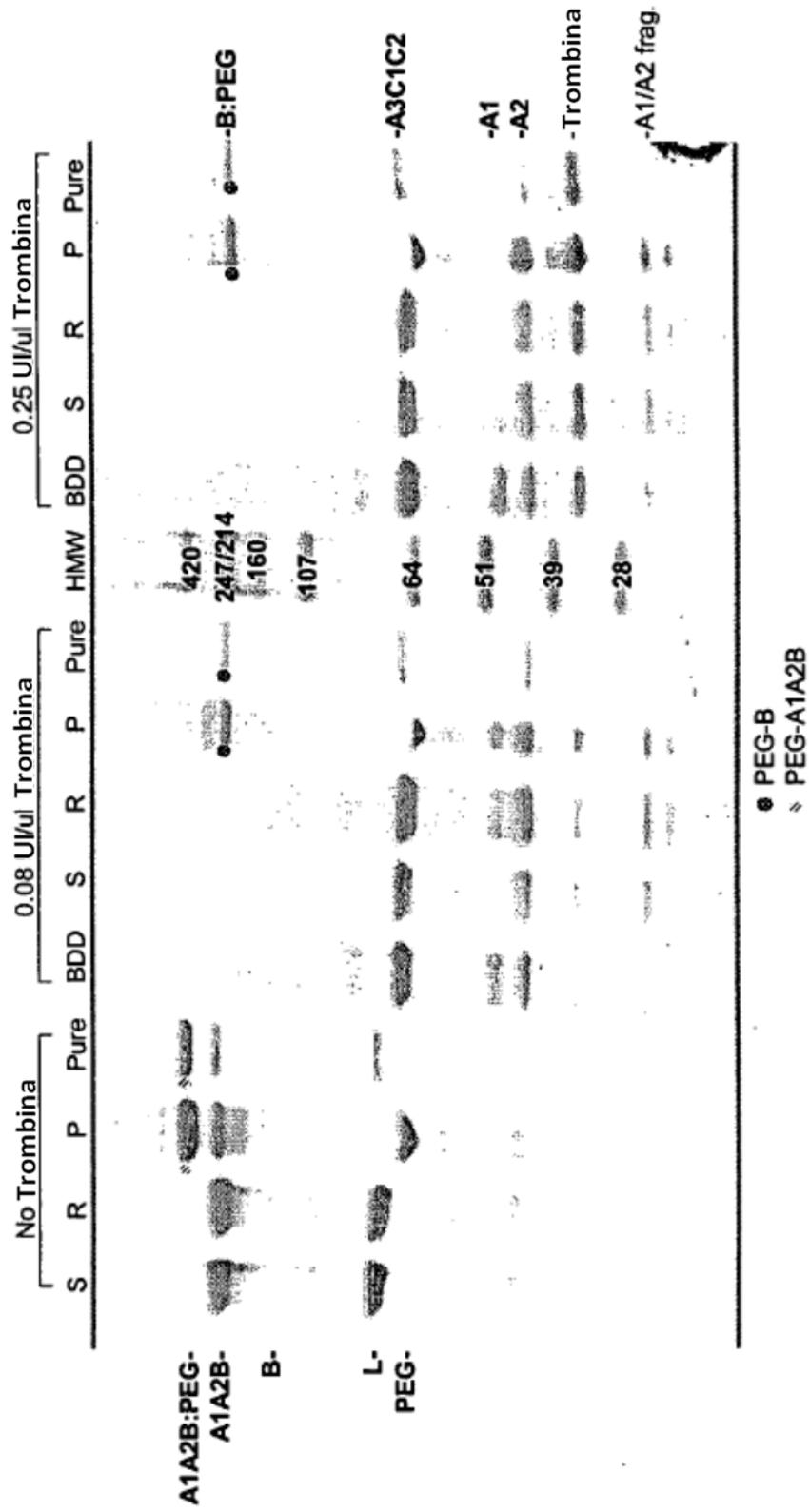


FIG. 8

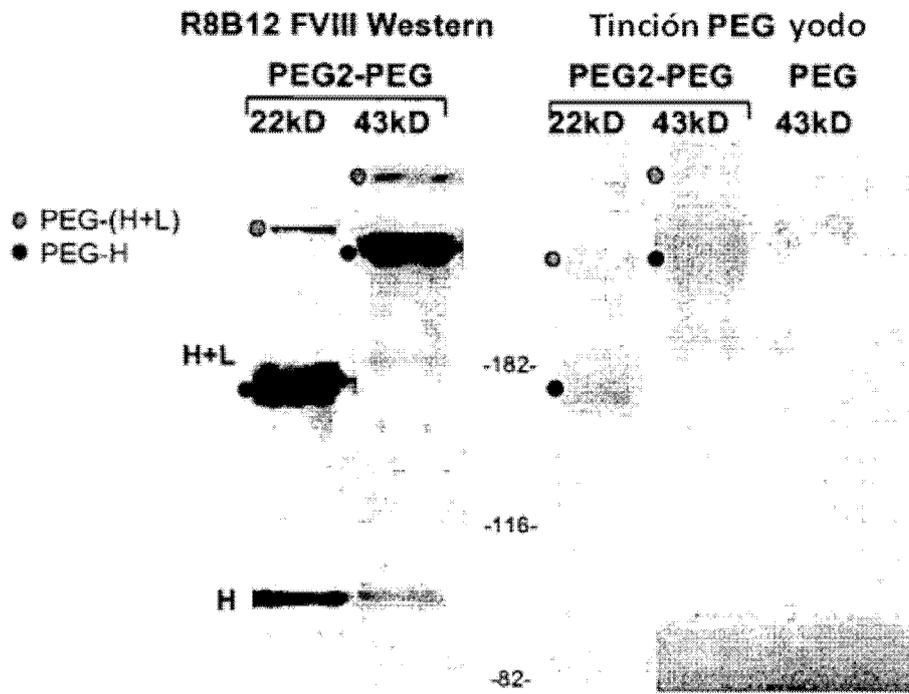


FIG. 9

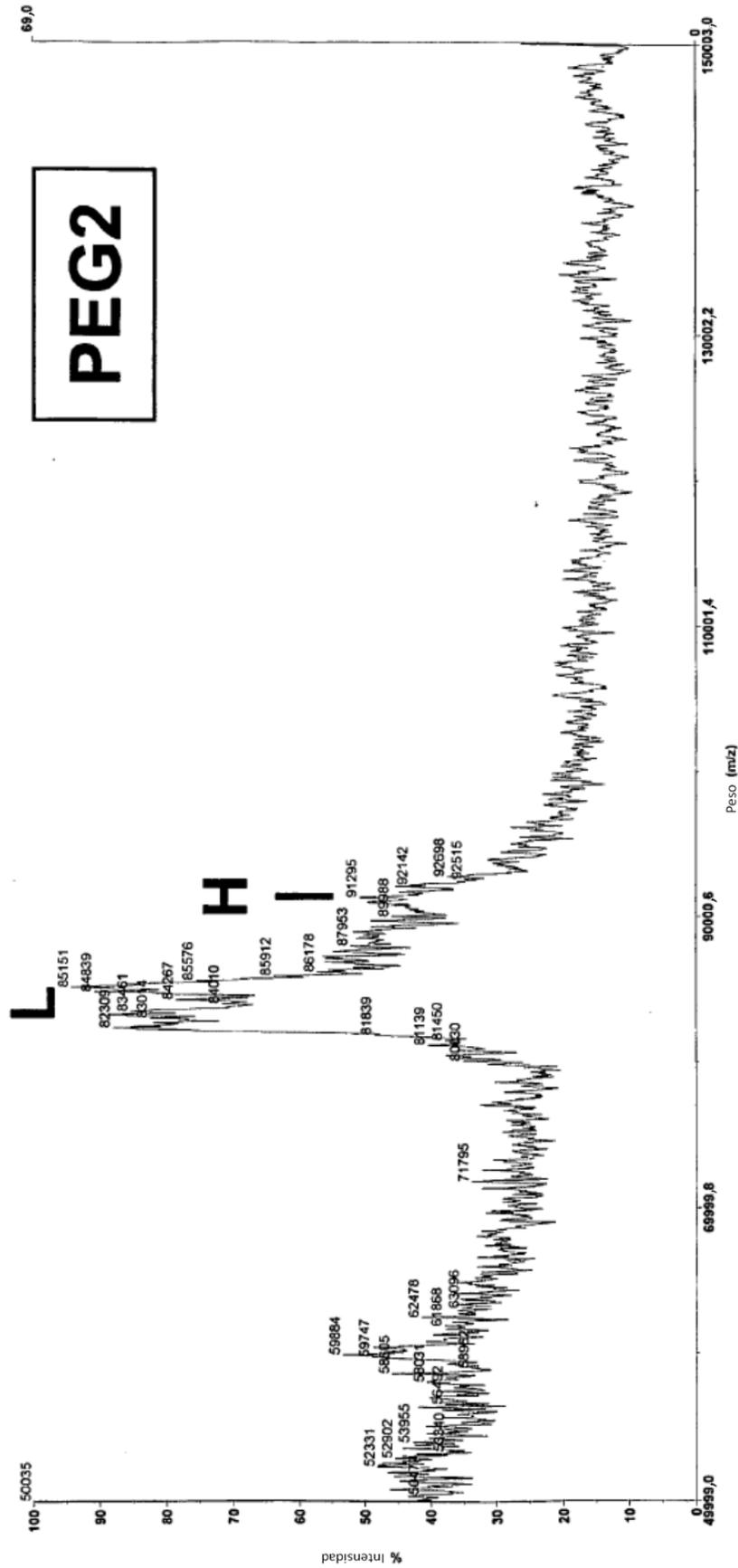
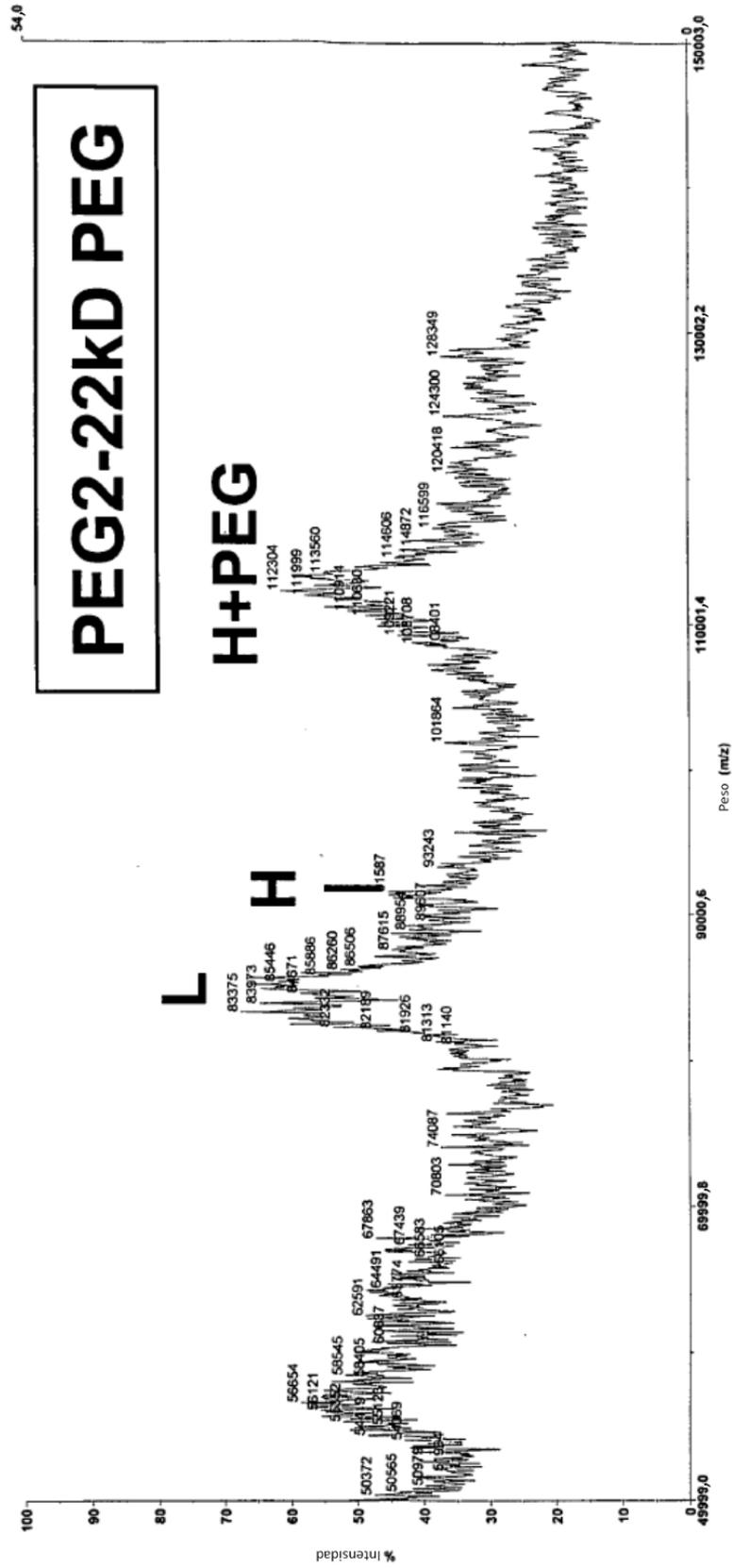


FIG. 10a



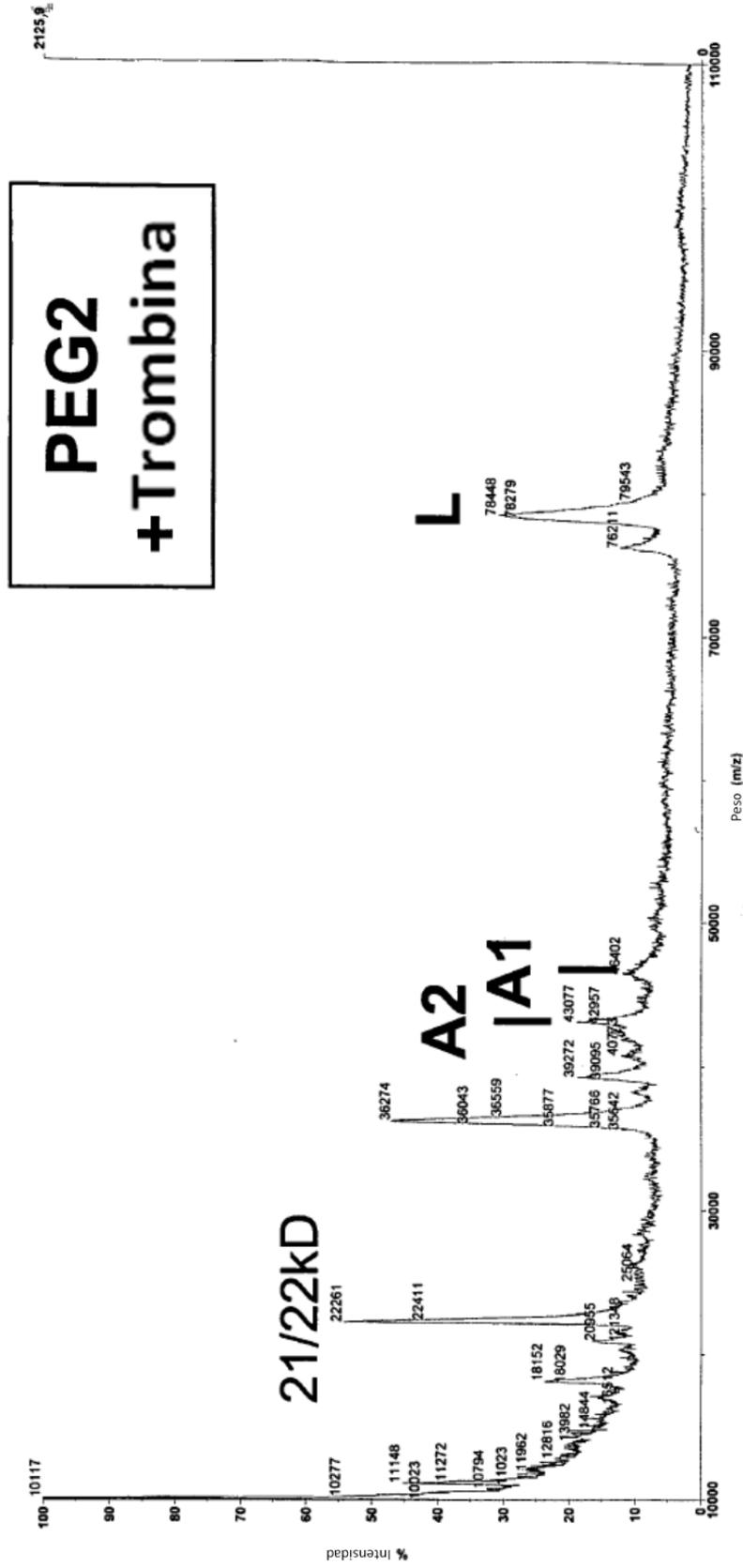


FIG. 10b

FIG. 11a

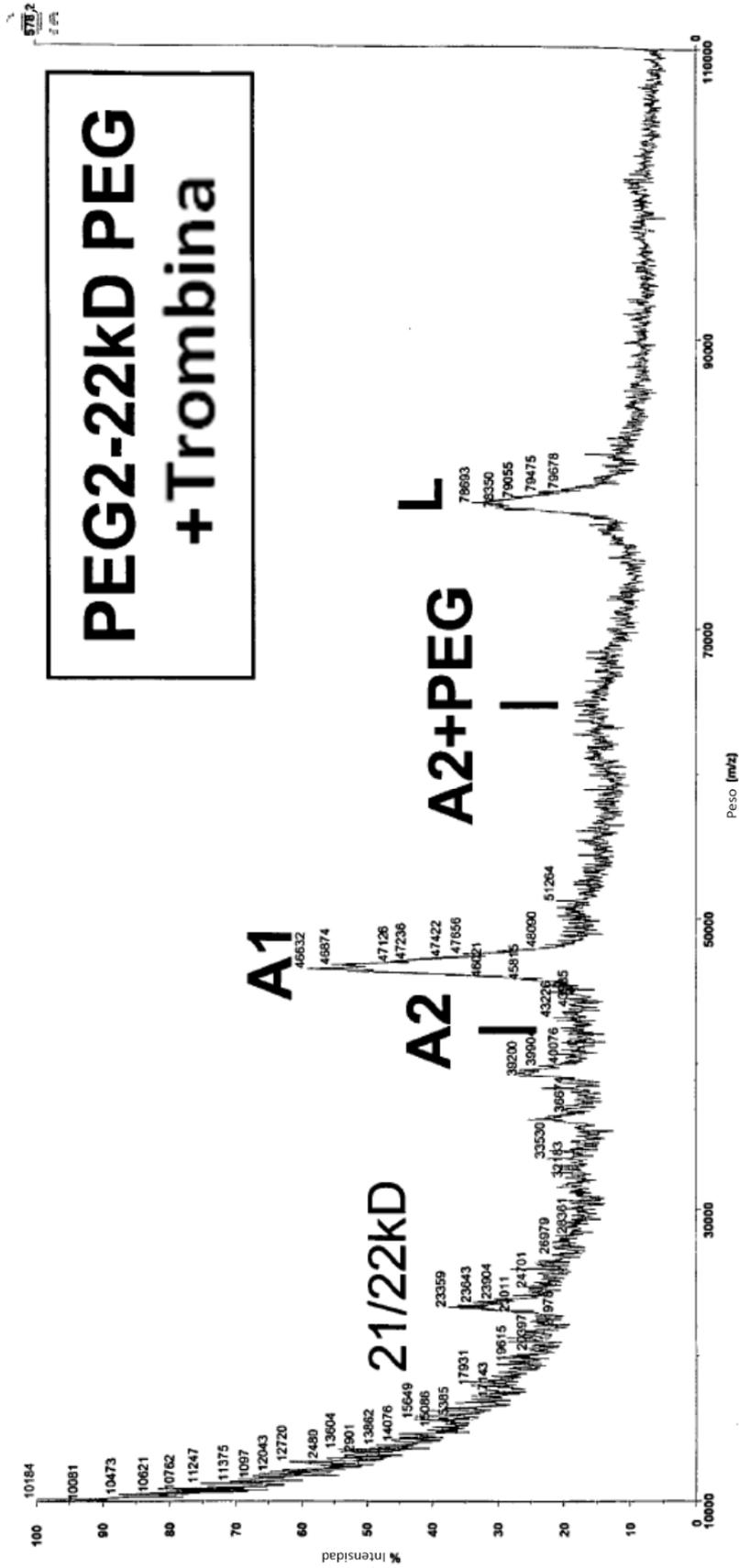
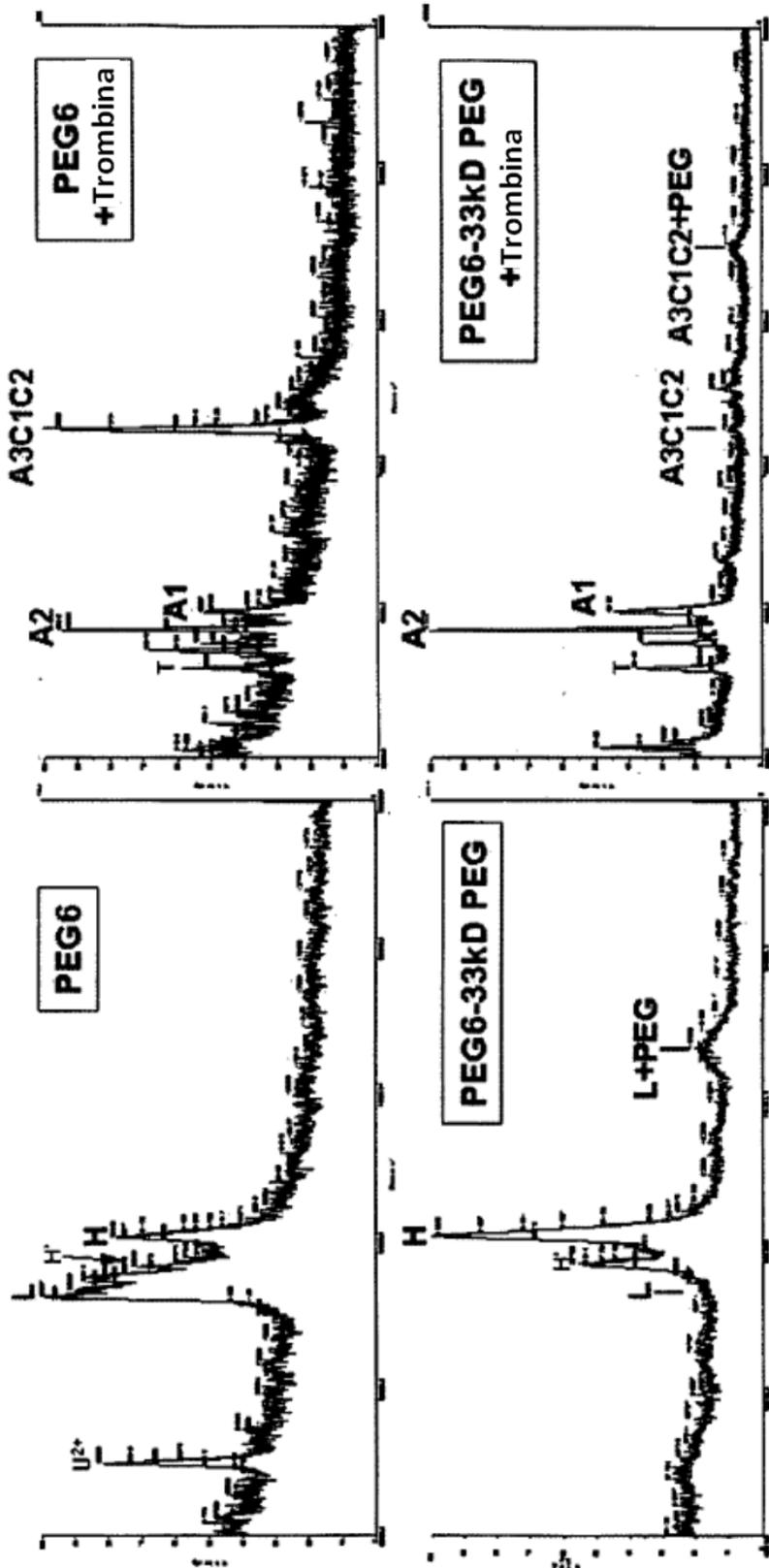


FIG. 11b



PEGilación selectiva en los dominios A3C1C2 de la cadena ligera confirmada por Espec de masas MALDI;
PEGilación A3C1C2 de la cadena ligera casi completa; PEGilación de A1 o A2 de la cadena pesada no detectable.

FIG. 12

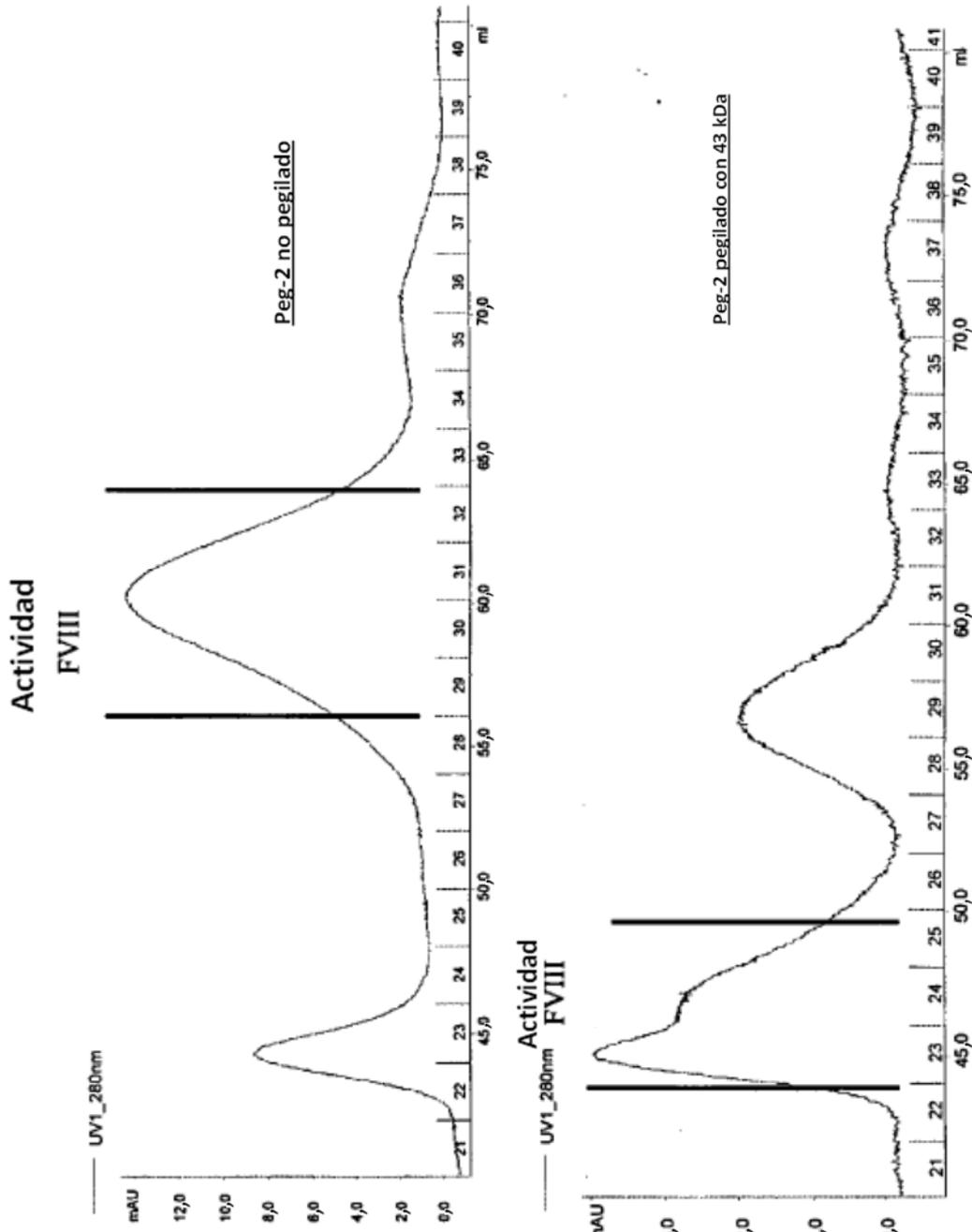


FIG. 13

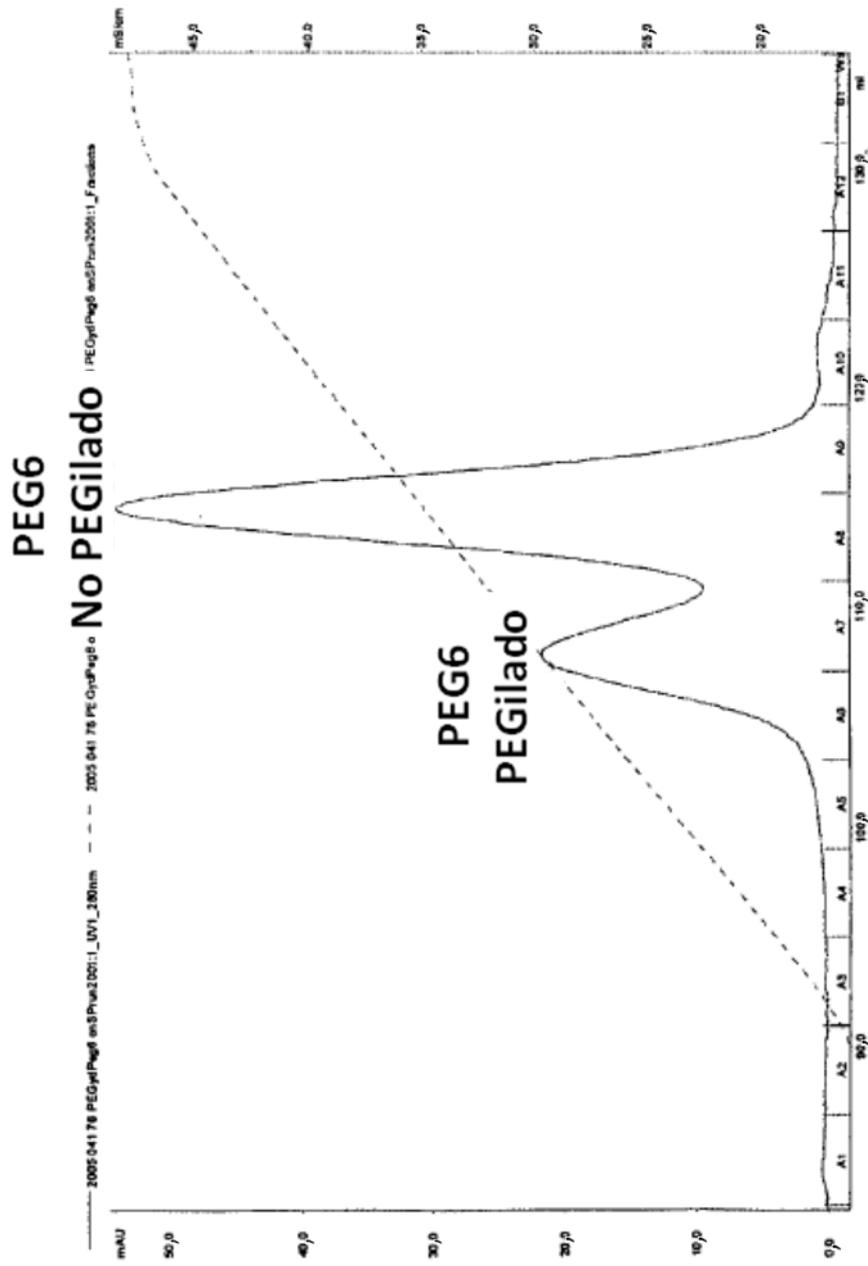


FIG. 14

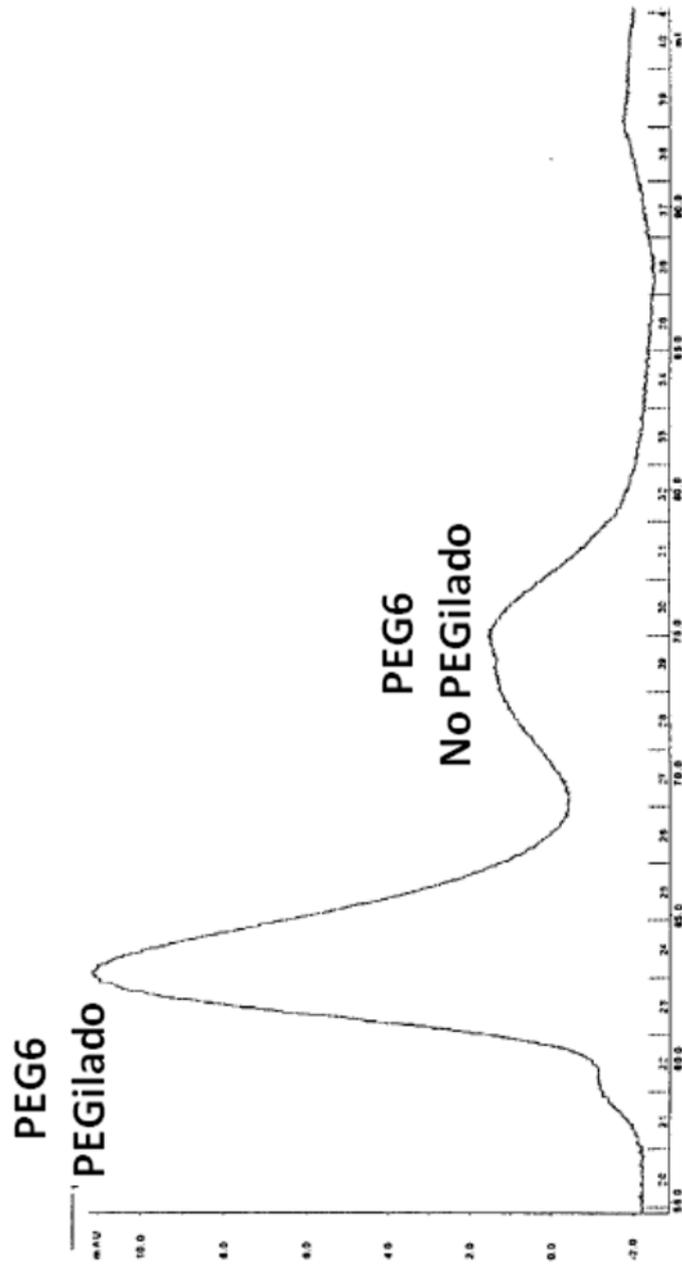


FIG. 15

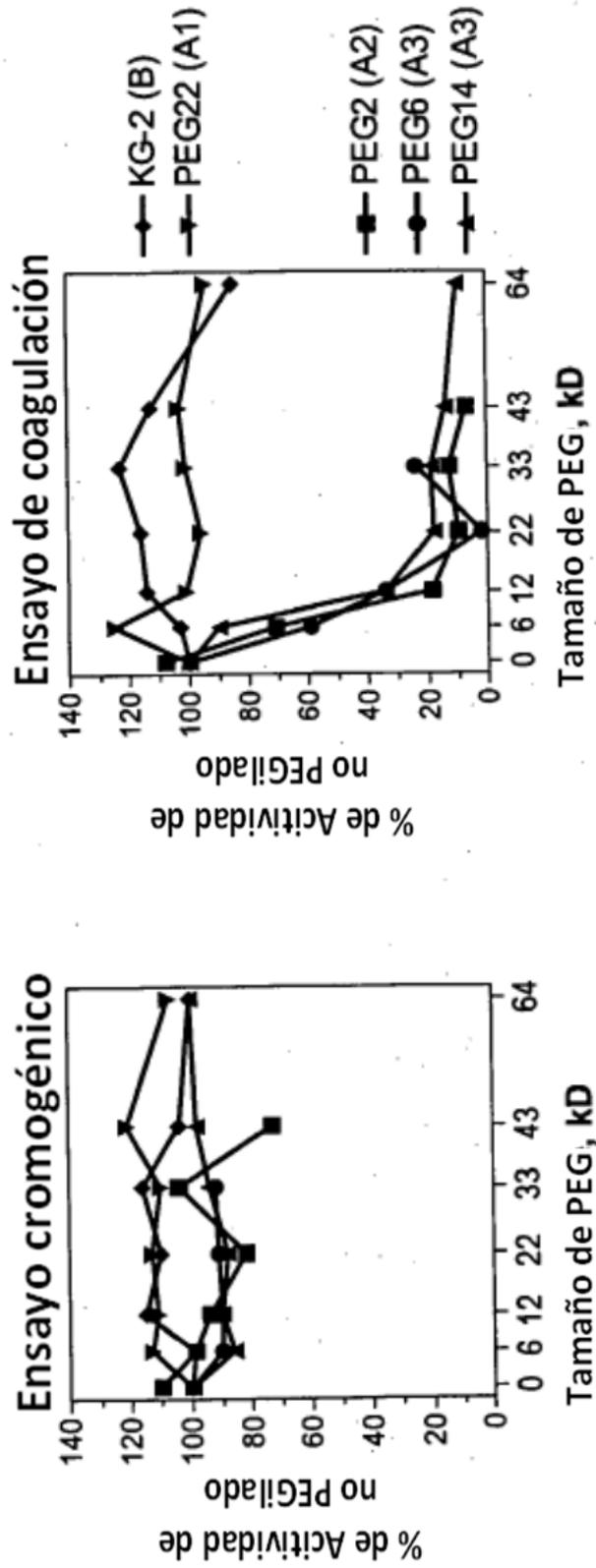


FIG. 16

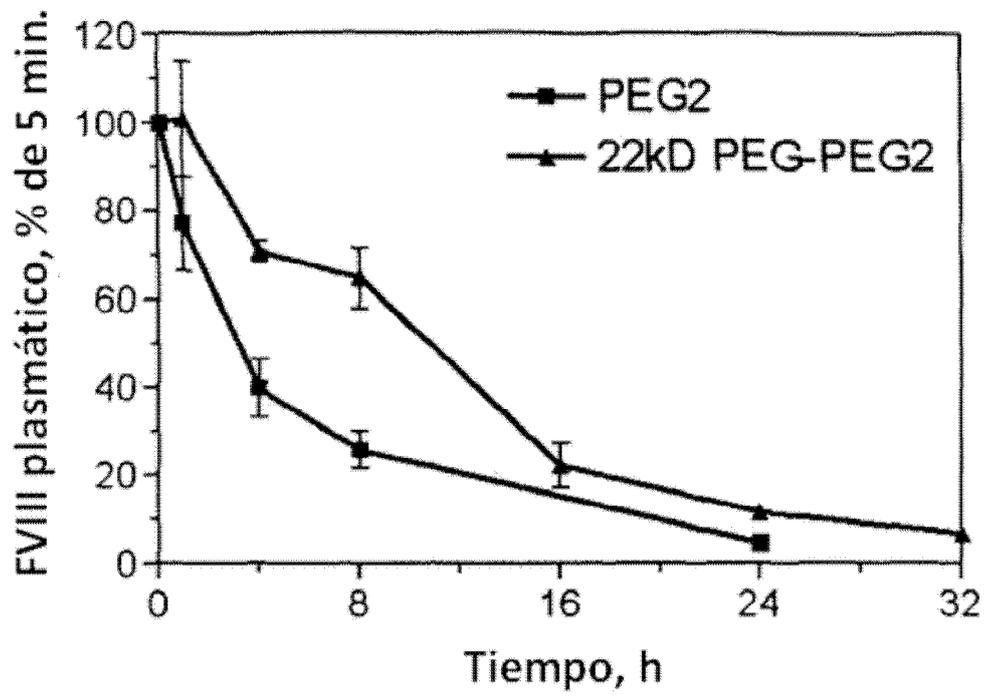


FIG. 17

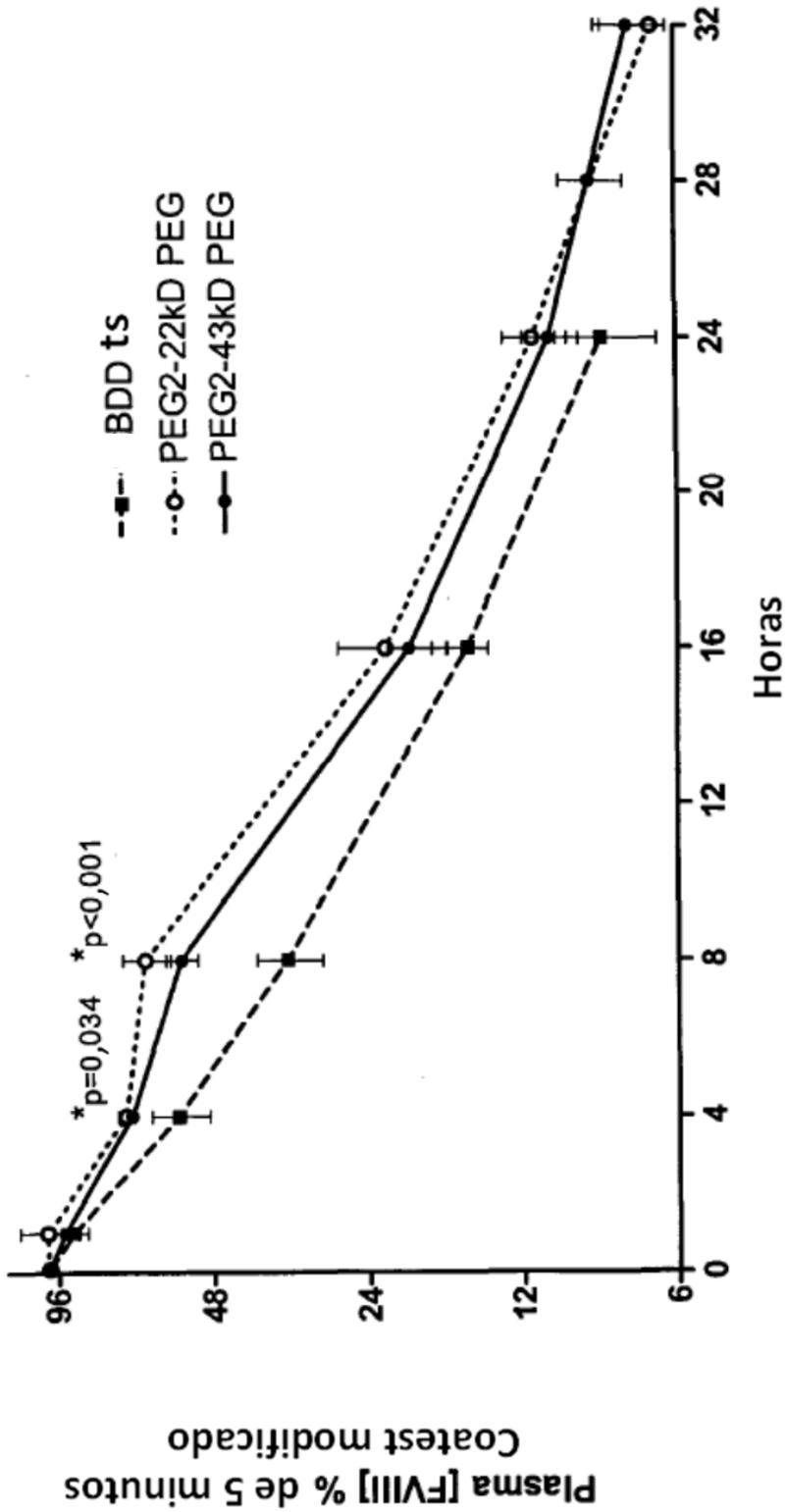


FIG. 18

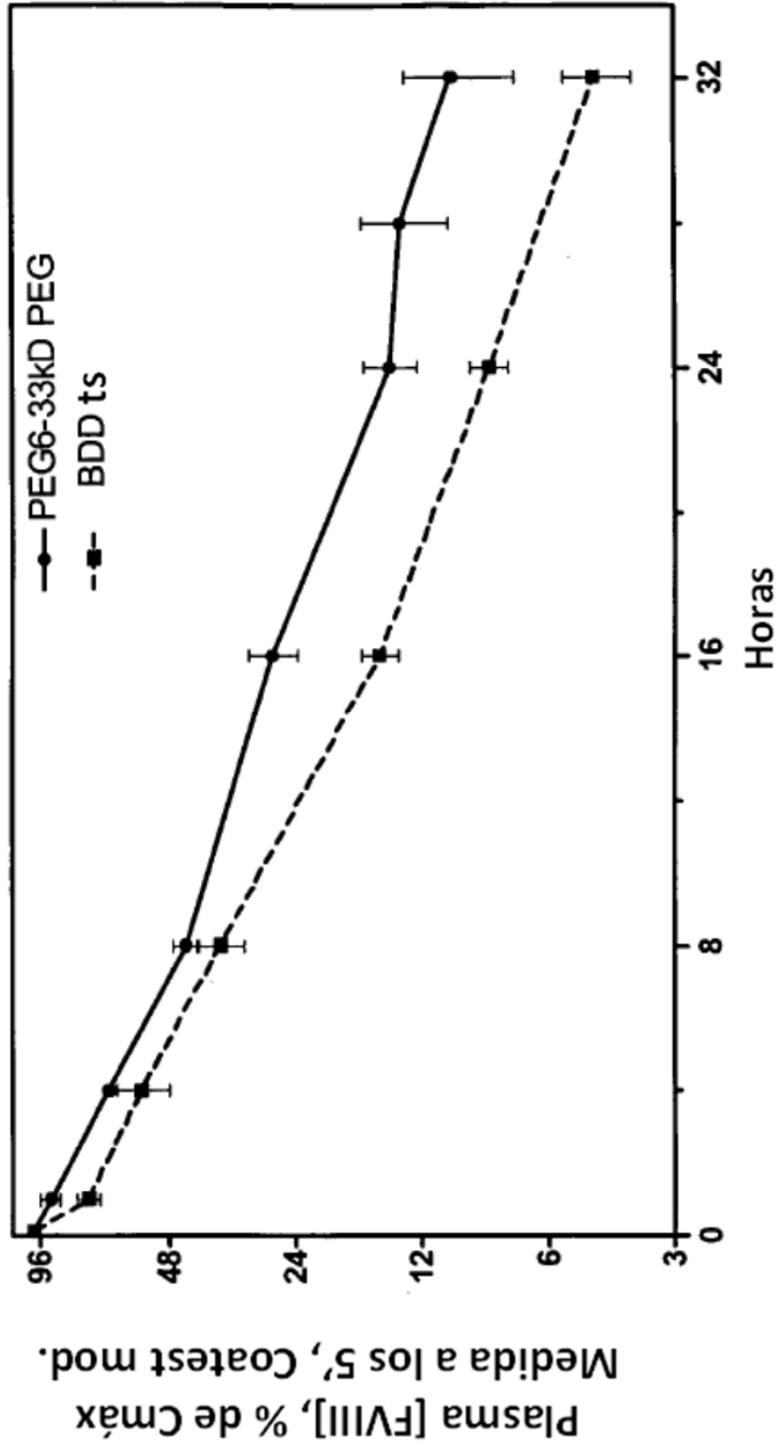


FIG. 19

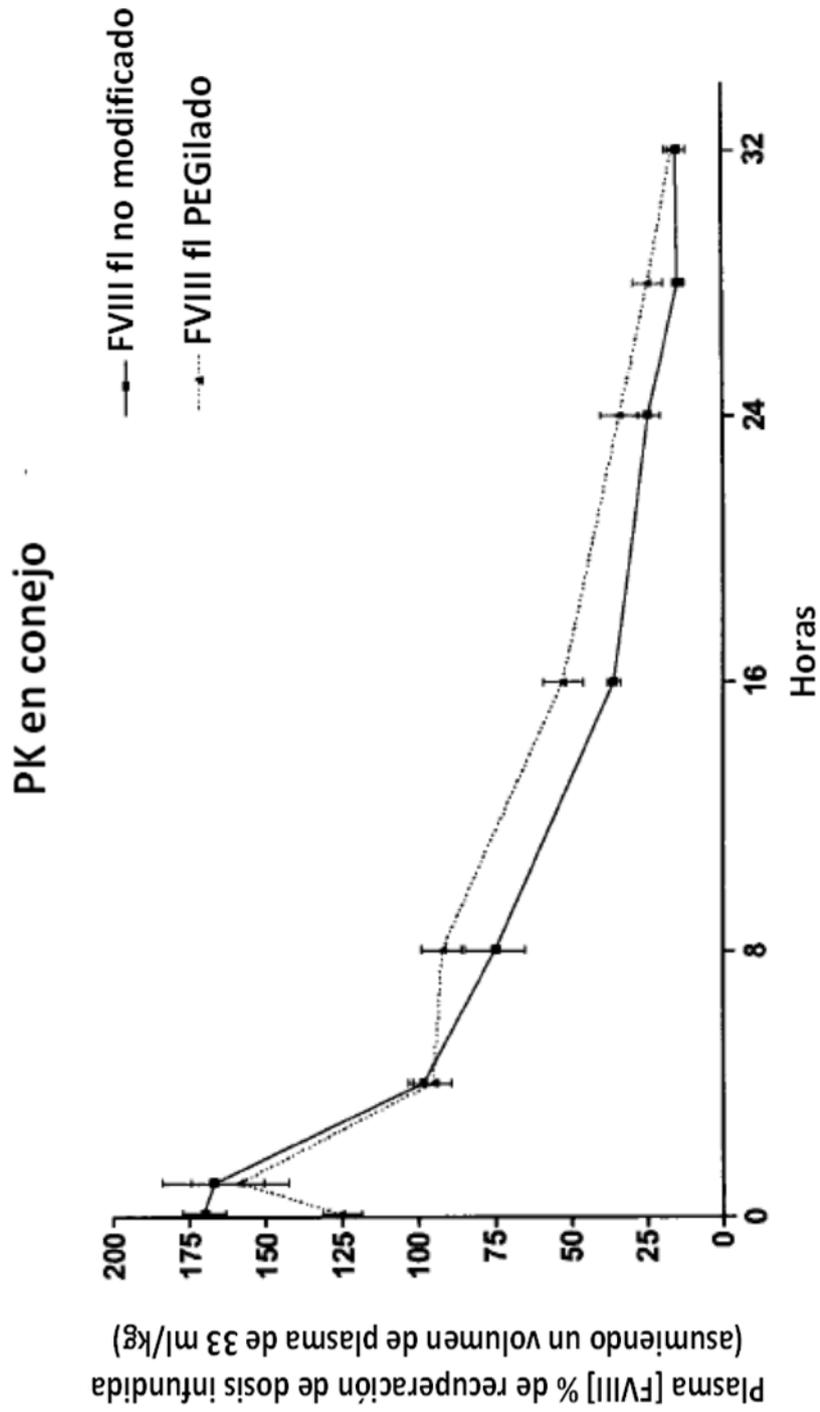


FIG. 20

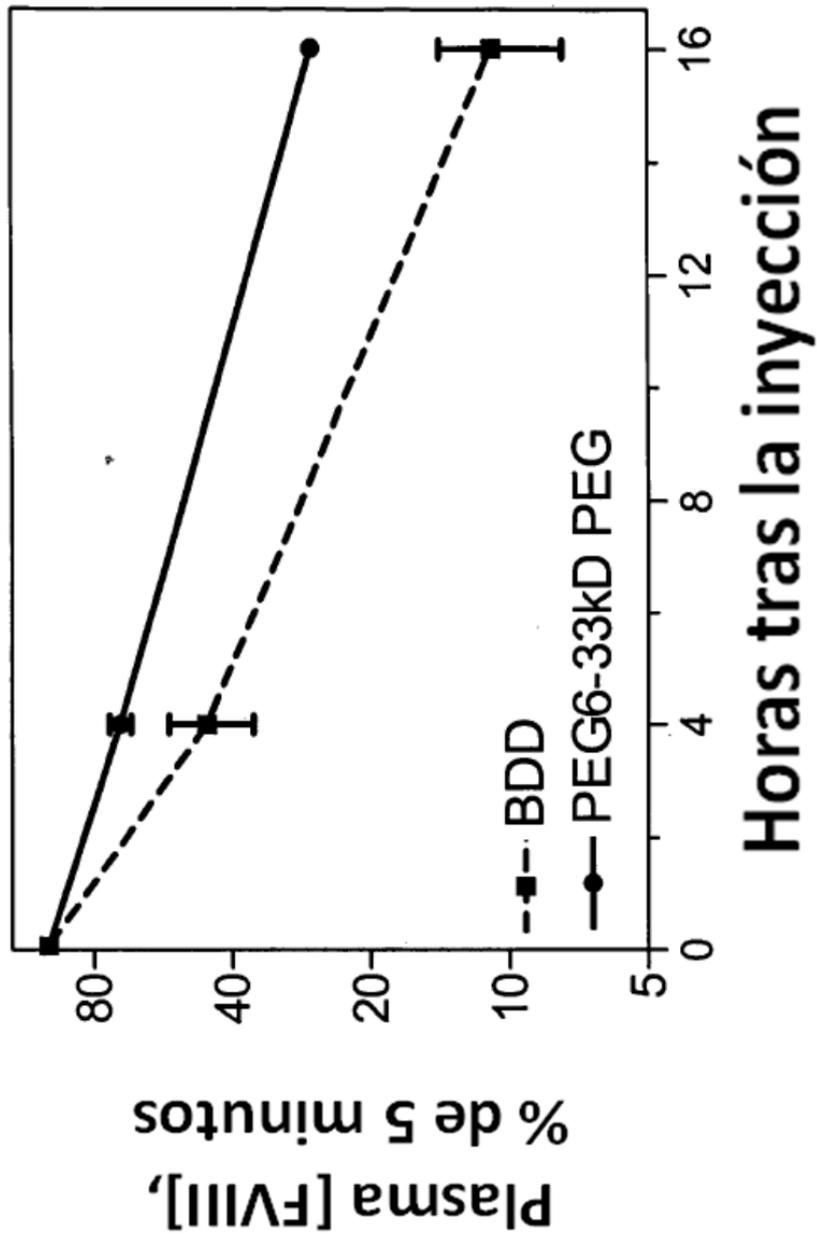
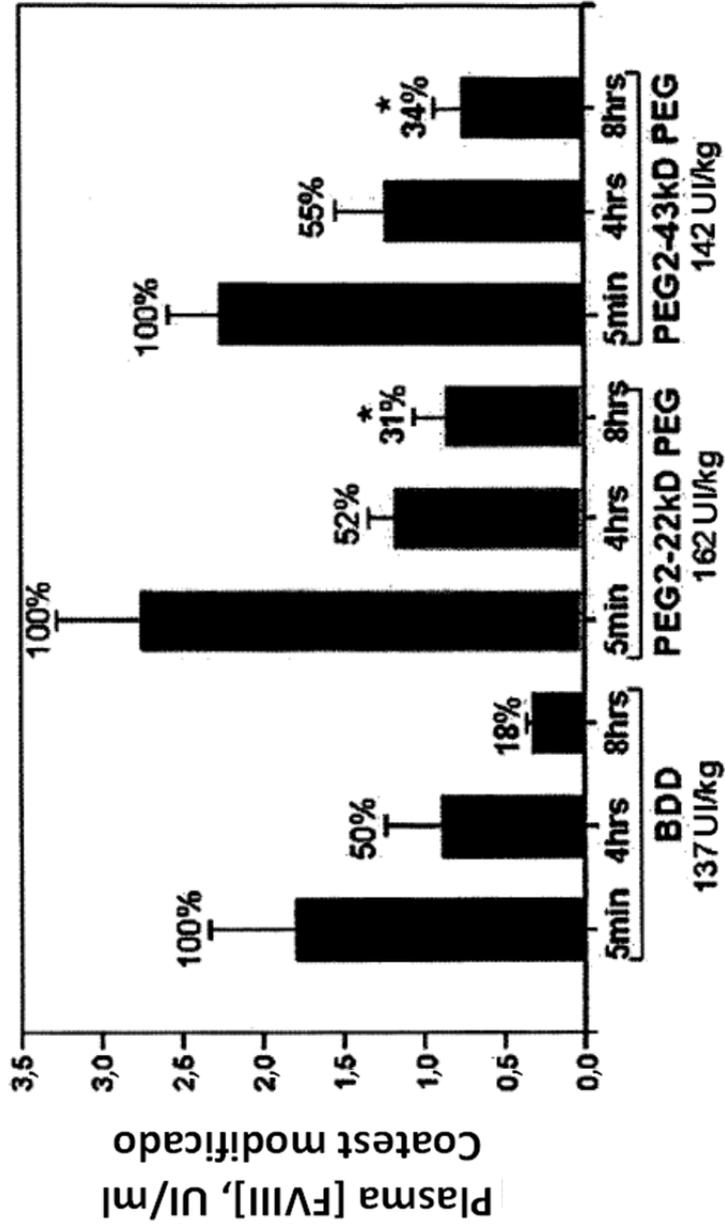


FIG. 21



El PEG2 PEGilado tiene mejor recuperación en el plasma que el BDDts, p = 0,05 a las 8 hrs.

FIG. 22.

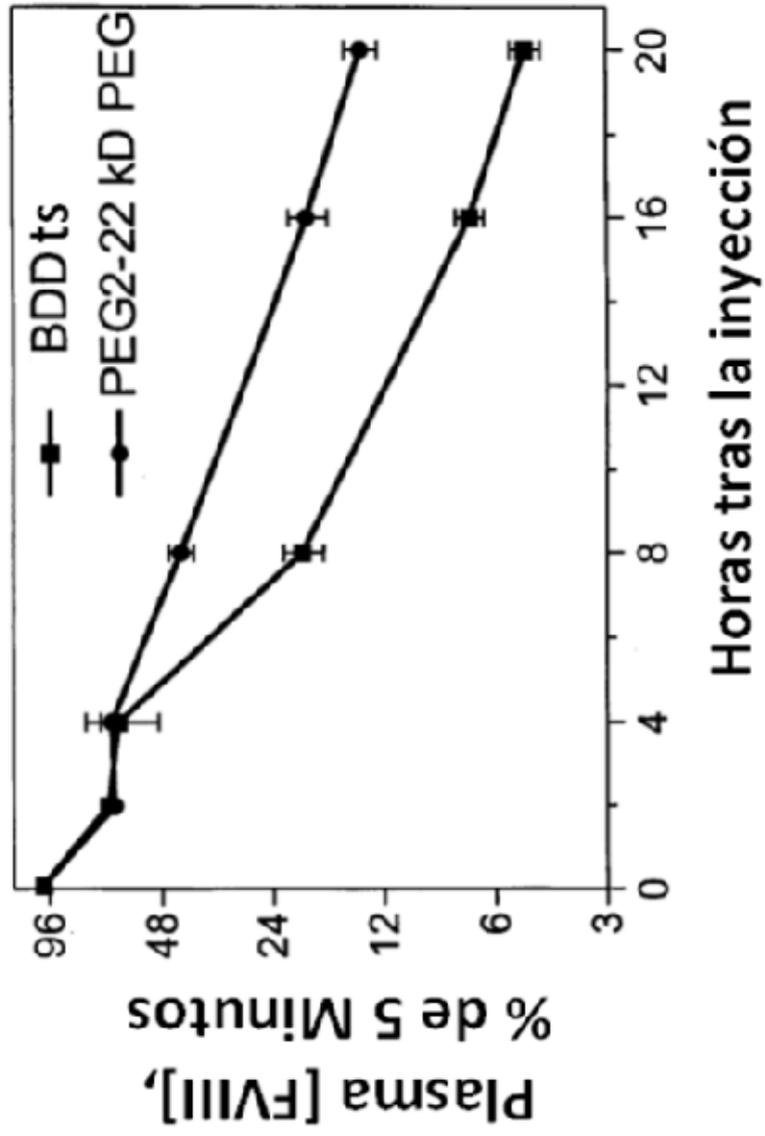


FIG. 23

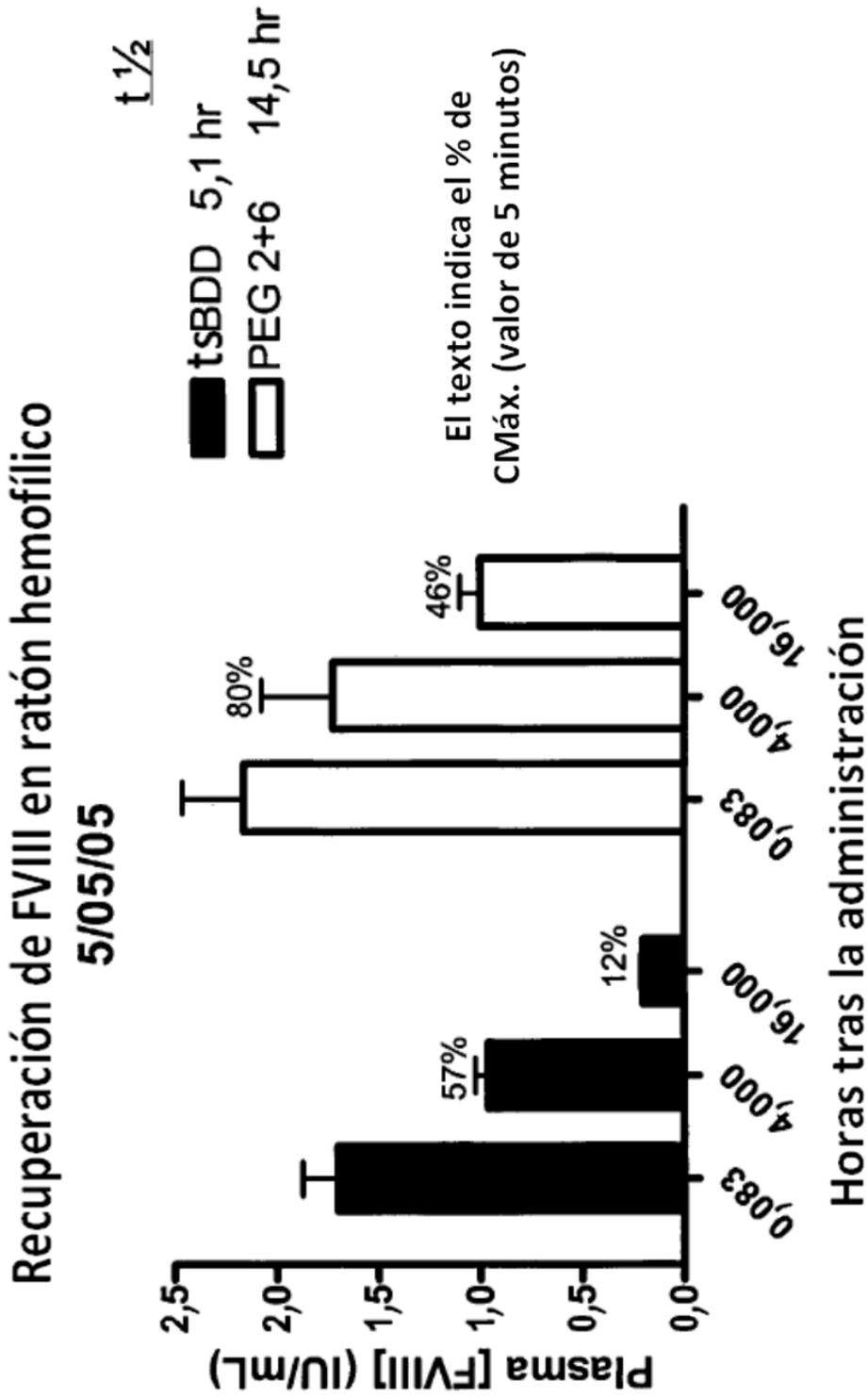


FIG. 24

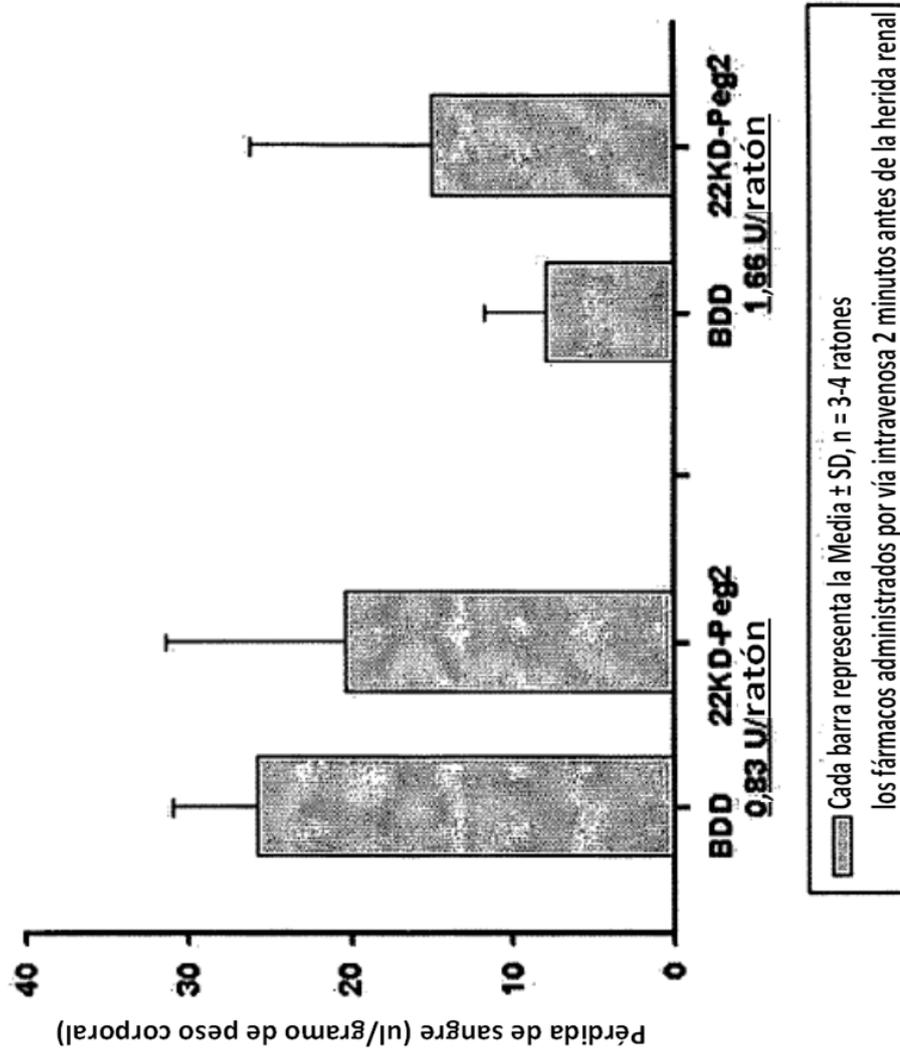


FIG. 25.

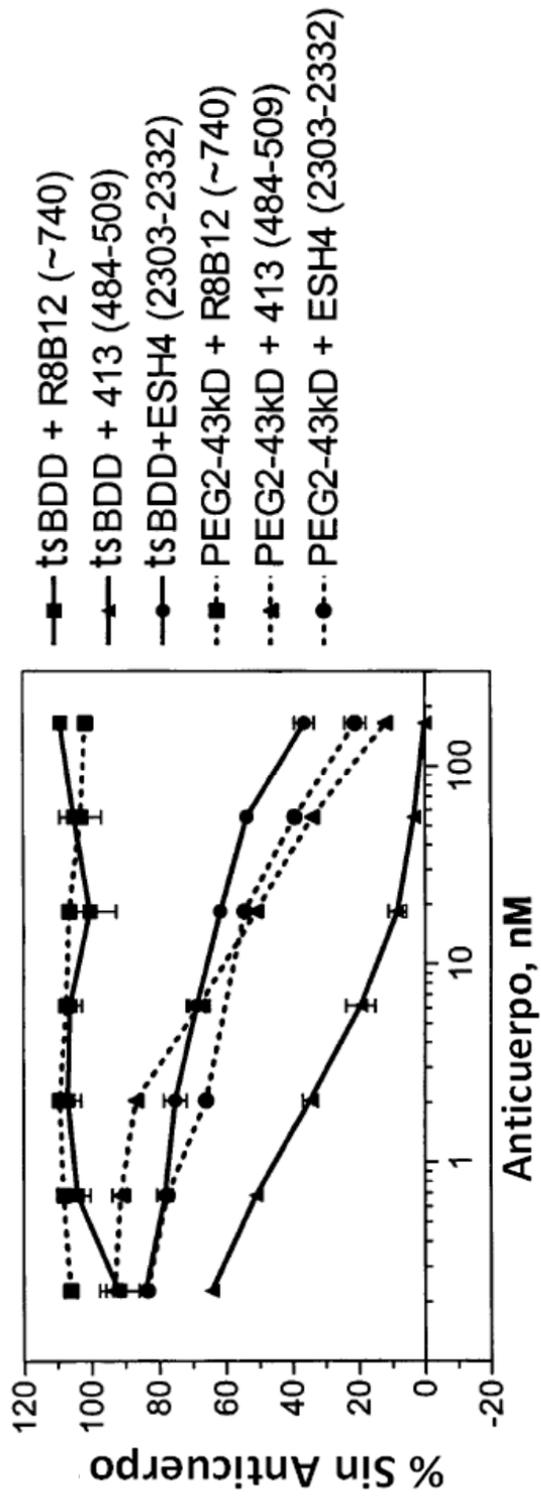


FIG. 26

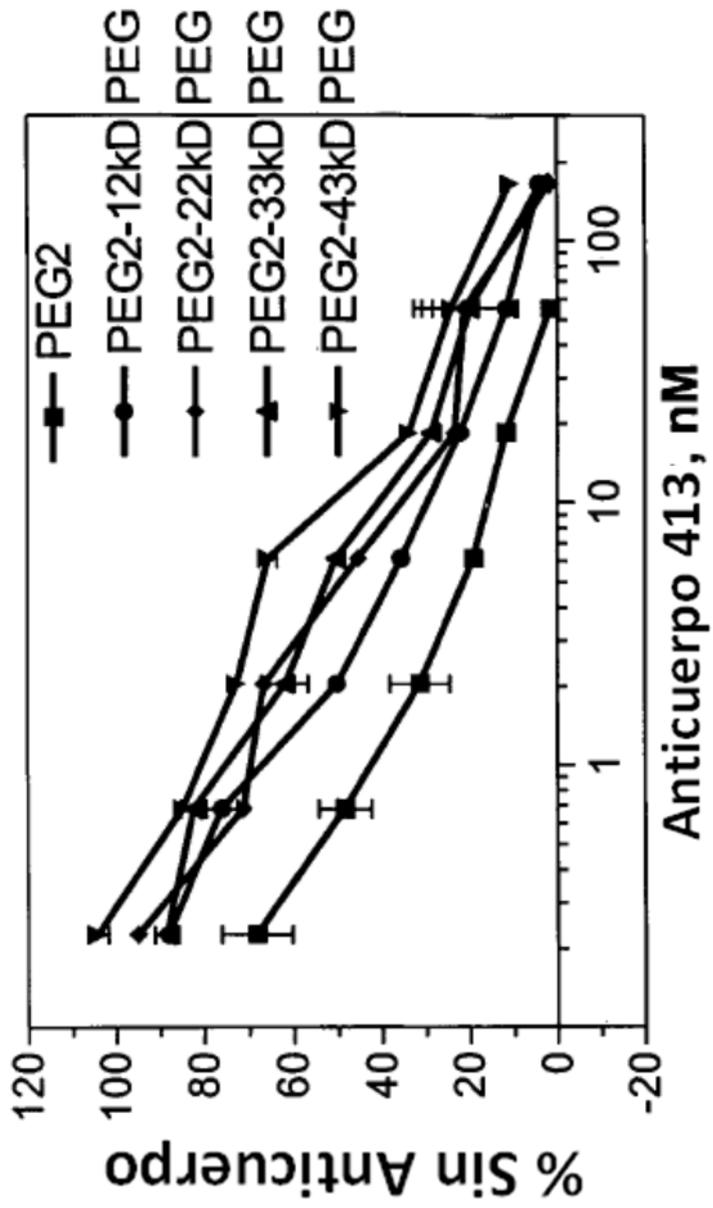


FIG. 27

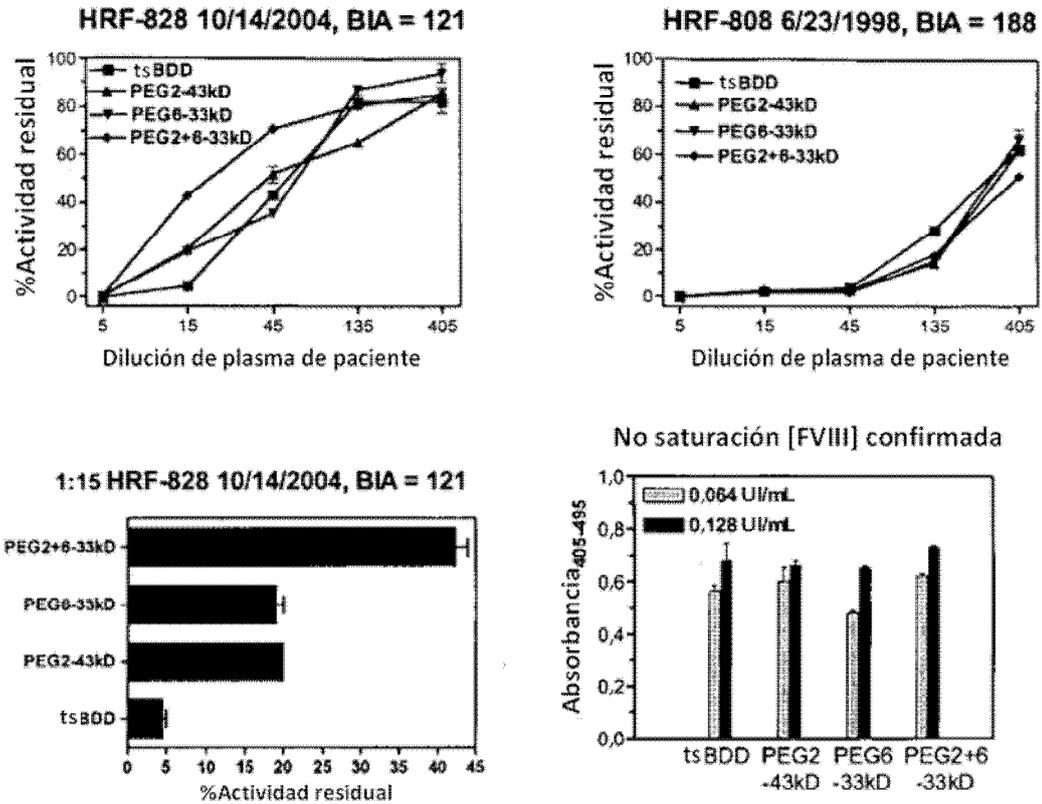


FIG. 28

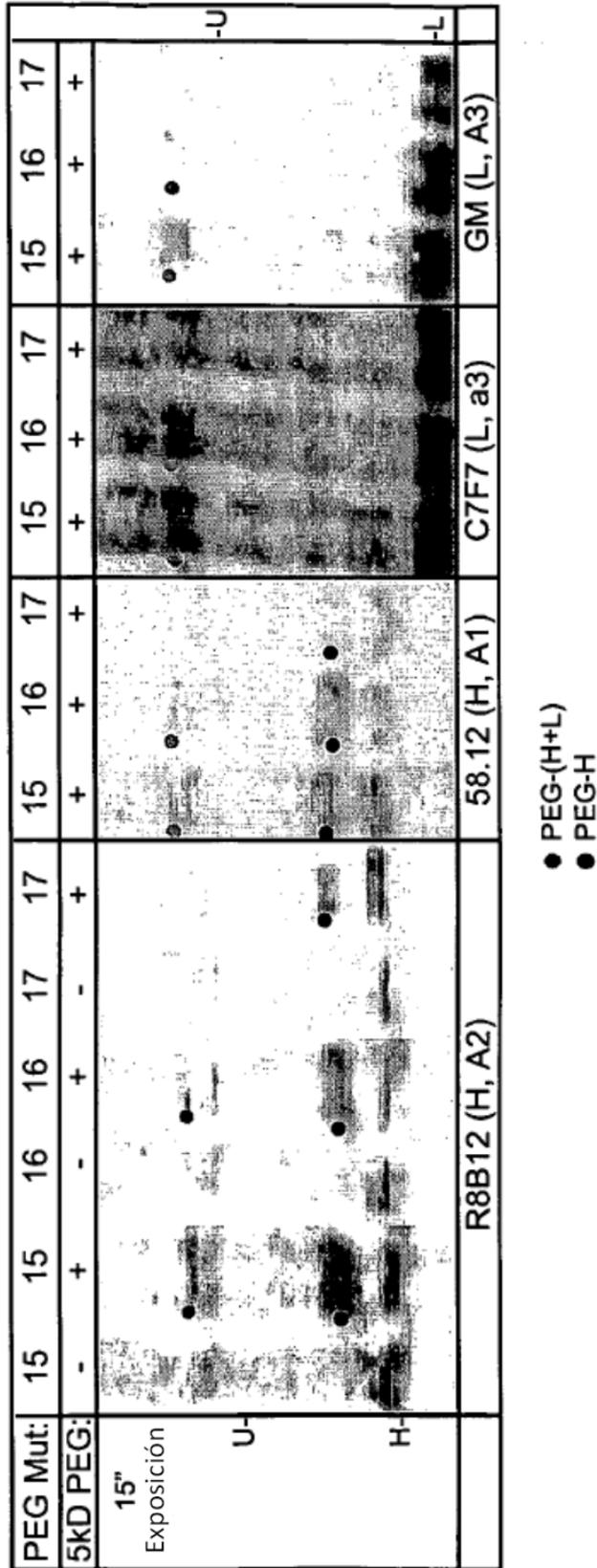
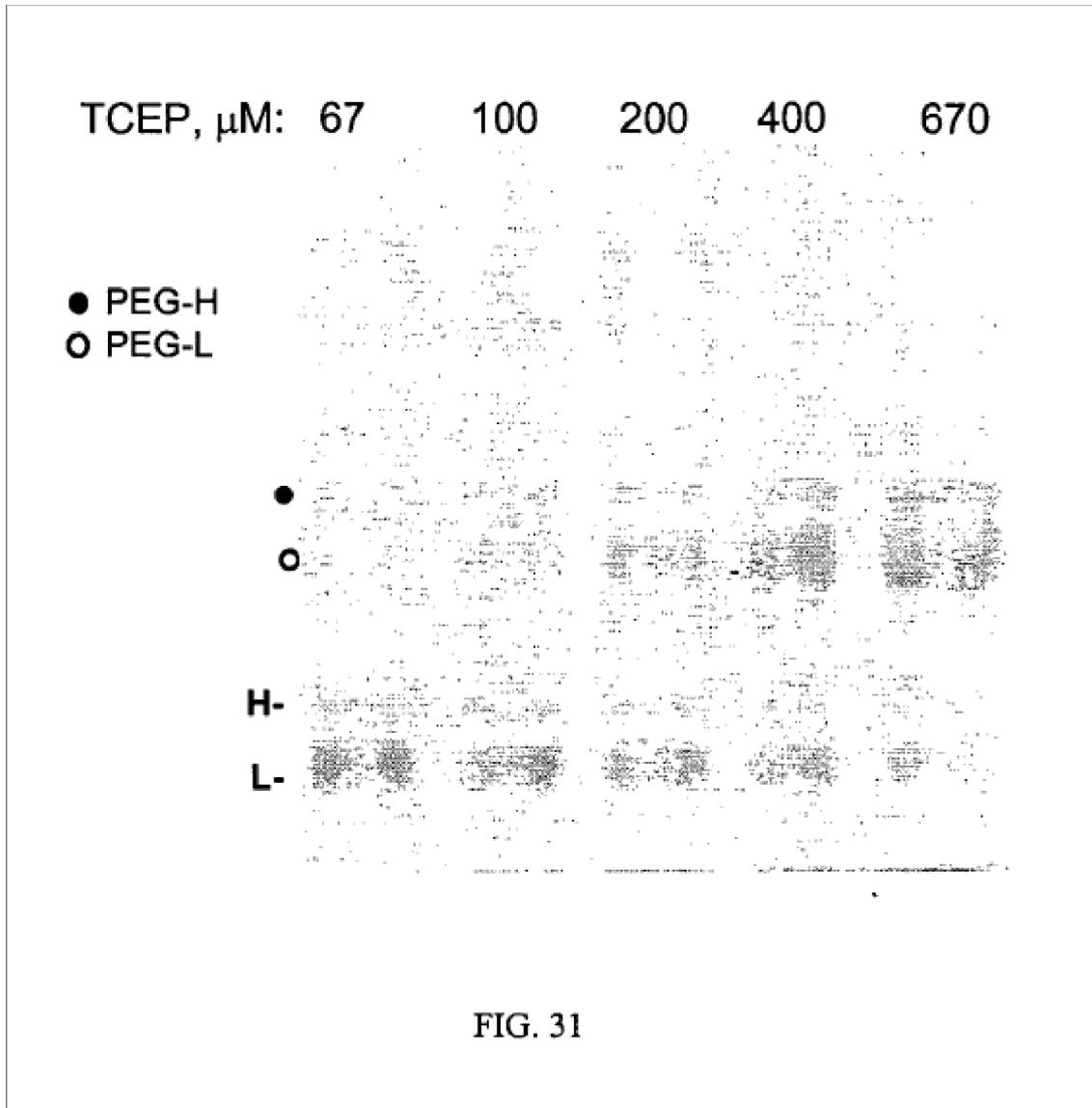


FIG. 30



Sumario de la comparación sobre la fracción A2 (43 kD)

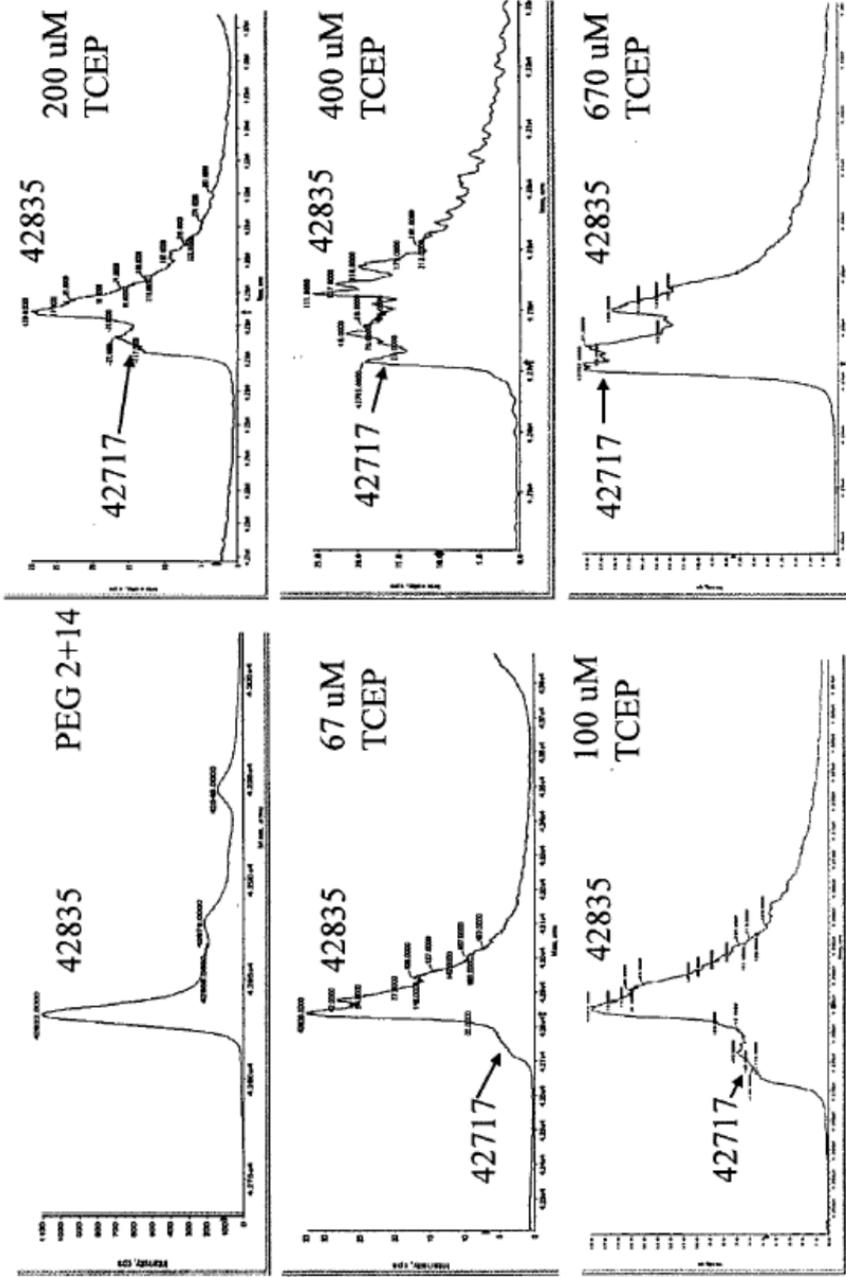


FIG. 32