

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 902**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2010 PCT/US2010/051285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11041770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2010 E 10821393 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2482841**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para mejorar la función del factor VIII de coagulación**

30 Prioridad:

**02.10.2009 US 248179 P**

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

**26.06.2019**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA  
(100.0%)**

**3401 Civic Center Boulevard  
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**ARRUDA, VALDER;  
CAMIRE, RODNEY y  
IACOBELLI, NICHOLAS**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 717 902 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

Composiciones y procedimientos para mejorar la función del factor VIII de coagulación.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la hematología. Más específicamente, la invención proporciona nuevas variantes del factor VIII de coagulación tal como se definen en las reivindicaciones.

### 10 **Antecedentes de la invención**

Se citan varias publicaciones y documentos de patentes a lo largo de la memoria descriptiva a fin de describir el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

15 La hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica ligada a X que es consecuencia de una deficiencia funcional del FVIII y afecta a 1:5000 varones en todo el mundo. Durante varias décadas, el modelo de perro HA ha sido el más utilizado para estudios preclínicos (1). En particular, en dos cepas de perros, la mutación subyacente consiste en una inversión en el intrón 22 del gen FVIII que es análoga a la mutación humana más común (2). Este modelo replica fielmente la enfermedad humana tanto a niveles genotípicos como fenotípicos (3, 20 4). Hasta la fecha no existe ninguna caracterización de la proteína cFVIII debido a las dificultades para purificar grandes cantidades de plasma canino y al rendimiento relativamente bajo en sistemas de expresión de FVIII recombinante en general. Aunque la secuencia de ADNc de cFVIII tiene una alta identidad de secuencia con el FVIII humano (hFVIII) (5), los perros adultos con HA desarrollan respuestas inmunitarias al exponerlos al hFVIII que impiden la evaluación de la eficacia y la seguridad de posibles tratamientos novedosos para HA. En 25 particular, entre los seres humanos, incluso pequeños cambios de nucleótidos en el gen hFVIII pueden predisponer a la formación de inhibidores (6).

La identificación de variantes de hFVIII que muestren propiedades de coagulación superiores es muy deseable. Es un objetivo de la invención proporcionar dichas proteínas para su utilización como agentes terapéuticos.

### 30 **Sumario de la invención**

Por lo tanto, según la presente invención, se proporciona una variante del factor VIII (FVIII) que muestra una capacidad mejorada para modular la hemostasia tal como se define en las reivindicaciones. La variante del FVIII 35 puede ser una variante humana, que carece de la mayor parte del dominio B, que comprende una sustitución de aminoácido R1645H y que muestra una actividad y una estabilidad específicas aumentadas con respecto al FVIII-BDD humano que carece de dicha sustitución. Las variantes que comprenden eliminaciones y modificaciones adicionales en el sitio de escisión de PACE/FURINA y que muestran un aumento de 3 veces en la actividad específica y una estabilidad mejorada en comparación con el FVIII humano con el dominio B eliminado 40 (BDD) que carece de dicha sustitución también están dentro del alcance de la invención. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las variantes descritas en la presente memoria. Dichos ácidos nucleicos se clonan opcionalmente en un vector de expresión. Las células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión también están abarcadas por la presente invención.

45 En otro aspecto más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante del factor VIII descrita anteriormente en un vehículo biológicamente compatible.

En la presente memoria también se describe un procedimiento para el tratamiento de un trastorno relacionado con la hemostasia en un paciente con necesidad de ello, que comprende la administración de una cantidad 50 terapéuticamente eficaz de la variante de FVIII procoagulante descrita en la presente memoria en un vehículo biológicamente aceptable. Dichos trastornos incluyen, de manera no limitativa, hemofilia A, hemofilia A con inhibidor, enfermedades de von Willebrand, sujetos sin hemofilia con inhibidores del FVIII, trastornos de plaquetas, enfermedades relacionadas con ADAMTS13, hemorragia asociada con traumatismo, coagulopatía por lesión y coagulación intravascular diseminada (DIC).

### 55 **Breve descripción de los dibujos**

**Figura 1: Análisis por inmunotransferencia Western de anticuerpos monoclonales cFVIII-BDD.** Se 60 cribaron anticuerpos monoclonales mediante inmunotransferencia Western utilizando cFVIII-BDD y cFVIII-BDD activado por trombina para determinar su especificidad para la cadena pesada (HC) o la cadena ligera (LC). Se cargó un microgramo de cFVIII o cFVIII activado en un gel reductor NuPage al 4-12% con el marcador Seablue Plus 2 (Invitrogen, Carlsbad, CA), se sometió a 200 V durante 50 minutos y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó cFVIII utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón (4 µg/ml), operación seguida de la detección con IgG anti-ratón de conejo IRDye 800CW (H&L) (Rockland 65 Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) y se analizó en un sistema de toma de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biociencias, Lincoln, NE).

**Figura 2: Caracterización bioquímica de FVIII-BDD.** (Figura 2A) El FVIII-BDD canino (c) se sintetiza predominantemente como una proteína monocatenaria de 160 kD, procesándose en una proporción menor como un heterodímero. La trombina (IIa) escinde cFVIII-BDD en los sitios indicados para producir cFVIII activado. (Figura 2B) La pureza de la proteína se evaluó cargando 4 µg de FVIII-BDD humano (H) y cFVIII-BDD (C) en una SDS-PAGE reductora, operación seguida de tinción con azul de Coomassie (izquierda; -IIa). Los FVIII-BDD (H o C; 800 nM) se incubaron con IIa (+IIa; 5 nM) durante 10 min y el FVIII activado resultante se sometió a una SDS-PAGE reductora (derecha, +IIa). Se indican los diversos dominios de FVIII: SC: monocatenario, HC: cadena pesada, LC: cadena ligera, A3-C1-C2 (73 kDa), A1 (50 kDa) y A2 (43 kDa). (Figura 2C) La actividad específica de cFVIII-BDD y hFVIII-BDD se comparó utilizando un aPTT de una o dos etapas en plasma humano deficiente. Para el ensayo de dos etapas (+IIa), se activaron FVIII-BDD (humano o canino; 20 nM) en Hepes 20 mM/NaCl 150 mM/CaCl<sub>2</sub> 5 mM/0.01% de Tween 80, pH 7.4 (tampón de ensayo) intencionadamente con IIa (40 nM) durante 30 segundos a 25°C. El FVIII activado se diluyó inmediatamente en un tampón de ensayo con albúmina al 0.1% y después se añadió subsiguientemente al ensayo de coagulación aPTT. En cualquiera de los aPTT de una (-IIa) o dos etapas (+IIa), la actividad específica de cFVIII-BDD fue 3 veces mayor que la de hFVIII-BDD. El cociente de activación fue 22 para cFVIII y 28 para hFVIII. (Figura 2D) Se utilizó un ensayo de Xasa purificada para evaluar la estabilidad del dominio A2. El ensayo de Xasa se realizó mediante la activación de cFVIII-BDD o hFVIII-BDD 20 nM con IIa 40 nM durante 30 segundos a 25°C. La reacción se detuvo mediante la adición de hirudina 60 nM. En varios puntos temporales después de la activación, se añadió FVIIIa (0.2 nM, final) al complejo Xasa [hFIXa (2 nM), hFX (300 nM) y fosfolípidos (20 µM, fosfatidilcolina/fosfatidilserina; 75:25)] y se midió la activación mediante el seguimiento de la generación de FXa utilizando un sustrato cromogénico.

**Figura 3. El FVIII-BDD canino es funcional y no induce una respuesta inmunitaria en perros HA.** Figura 3A) Tiempo de coagulación de sangre completa (WBCT) después de tres inyecciones de cFVIII-BDD en un perro con HA (media ± SD). El WBCT se acortó dentro de un periodo de 5 minutos desde la infusión de proteínas desde > 45 minutos (referencia) a 13-16.5 min (intervalo normal: 8-12 min). Figura 3B) Antígeno de FVIII (líneas azules) y actividad de coagulación (línea roja) después de inyección IV de cFVIII-BDD. Para una infusión de proteínas del mismo perro, la actividad de cFVIII se determinó mediante el ensayo Coatest y los niveles de antígenos se determinaron mediante ELISA específico para la cadena pesada (HC) o ligera (LC) de cFVIII. El Coatest se realizó utilizando cFVIII purificado como patrón. Una unidad se define como 100 ng/ml. Figura 3C) Supervisión de la formación de anticuerpos e inhibidores de cFVIII-BDD en perros HA. Además de los perros adultos, los animales no tratados previamente neonatales que no habían sido expuestos previamente a plasma canino normal se trataron con cFVIII-BDD. IgG representa tanto datos de IgG1 como de IgG2.

**Figura 4. Recuperación de FVIII después de la exposición a anticuerpos anti-hFVIII.** Se incubaron diferentes concentraciones de cFVIII-BDD o hFVIII-BDD con plasma humano que contiene anticuerpos neutralizantes específicos de hFVIII (11 B.U.) (George King Biomedical, Inc., Overland Park, KS) y la actividad residual de FVIII se midió inmediatamente o después de la incubación a 37°C durante 2 horas. Una unidad se define como 100 ng/ml.

**Figura 5. FVIII humano (WT) o FVIII variante 1645H y FVIII canino (WT) o cFVIII variante H1637R.** SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (izquierda; +activación de trombina-IIa). El FVIII-BDD (humano o canino; 800 nM) se incubó con IIa (+IIa; 5 nM) durante 10 minutos y el FVIII activado resultante se sometió a una SDS-PAGE reductora (derecha, +IIa). Los diversos dominios de FVIII están indicados: SC: monocatenario, HC: cadena pesada, LC: cadena ligera, A3-C1-C2 (73 kDa), A1 (50 kDa) y A2 (43 kDa).

**Figura 6. Estabilidad en el dominio A2 del FVIII humano (WT) y FVIII variante RH.** El ensayo de Xasa se realizó activando 20 nM de las formas de hFVIII-BDD con IIa 40 nM durante 30 segundos a 25°C. La reacción se detuvo mediante la adición de hirudina 60 nM. En varios puntos temporales después de la activación, se añadió FVIIIa (0.2 nM, final) al complejo Xasa [hFIXa (2 nM), hFX (300 nM) y fosfolípidos (20 µM, fosfatidilcolina/fosfatidilserina; 75:25)] y se midió la activación mediante el seguimiento de la generación de FXa utilizando un sustrato cromogénico.

**Figura 7. Estudios de lentivirus PAGhF8<sup>RH</sup>.** (A) Nivel antigénico de phF8 en plaquetas a partir de ratones F8<sup>nu1o</sup> reconstituidos con médula de la línea de ratones hF8.38/F8<sup>nu1o</sup> (#38) o de ratones F8<sup>nu1o</sup> transfectados con lentivirus PhF8 o PhF8<sup>RH</sup> controlado por el promotor PF4 (figura 2C). (B) Estudios de lesión de la arteria carótida con FeCl<sub>3</sub> de ratones F8<sup>nu1o</sup> reconstituidos con médula transducida con un lentivirus vacío FPW o hBF8, cBF8 o hBF8<sup>RH</sup> controlados por PF4. Cada conjunto de 3 barras va de izquierda (claro) a derecha (oscuro): 20%, 15% y 10% de FeCl<sub>3</sub>, lesiones de 3 min. N = 3-5 ratones por rama. Se muestra la media ± 2 SE. \* = p < 0.01 en comparación con FPW. (C) Estudios de lesión con láser de arteriola de cremáster de ratones WT, F8<sup>nu1o</sup>, PhF8/F8<sup>nu1o</sup> y PhF8<sup>RH</sup>/F8<sup>nu1o</sup>. Se muestra la acumulación de fibrina (rojo) y plaquetas (verde) a lo largo de los 3 minutos. Se indican el número de lesiones y ratones estudiados.

**Descripción detallada de la invención**

La producción de factor VIII canino con el dominio B eliminado (cFVIII-BDD) recombinante reveló inesperadamente rendimientos proteicos superiores con un aumento de 3 veces de la actividad específica y la estabilidad con respecto al FVIII-BDD humano (hFVIII-BDD). El cFVIII-BDD es eficaz en la inducción de hemostasia en plasma humano que contiene inhibidores de FVIII. La infusión de cFVIII-BDD en perros con hemofilia A dio como resultado la corrección del fenotipo de la enfermedad con un perfil farmacocinético similar a la experiencia clínica con hFVIII-BDD. En particular, las provocaciones de tolerancia inmunitaria con cFVIII-BDD en hemofilia A en jóvenes y adultos no indujeron la formación de anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes para cFVIII. Estos datos indican que la variante de FVIII descrita en la presente memoria deberá mostrar una mayor eficacia y una mayor seguridad en estudios preclínicos de nuevos tratamientos para la hemofilia A.

I. Definiciones:

Se han utilizado en la presente memoria anteriormente y también se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones varios términos relacionados con las moléculas biológicas de la presente invención.

La frase "factor VIII variante (FVIII)" se refiere a un FVIII modificado que se ha alterado genéticamente de tal forma que la proteína codificada muestre un aumento de 3 veces en la actividad específica y una estabilidad mejorada en comparación con el FVIII sin modificar. Las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria pueden obtenerse fácilmente de GenBank. Para FVIII humano, ver el número de acceso NG-011403.1. Para FVIII canino, ver el número de acceso NM-001003212-1. cFVIII-BDD se refiere a una variante de FVIII que carece del dominio B.

La frase "trastorno relacionado con la hemostasia" se refiere a trastornos hemorrágicos, tales como hemofilia A, pacientes con hemofilia A con anticuerpos inhibidores, deficiencias en factores de coagulación VII, VIII, IX y X, XI, V, XII, II, factor de von Willebrand, deficiencia en FV/FVIII combinados, deficiencia de vitamina K epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma-carboxilasa; hemorragia asociada a traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, apoplejía, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC); sobreanticoagulación asociada con heparina, heparina de bajo peso molecular, pentasacárido, warfarina, antitrombóticos de molécula pequeña (es decir, inhibidores de FXa); y trastornos plaquetarios tales como el síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman y deficiencia de acumulación de almacenamiento.

Haciendo referencia a los ácidos nucleicos de la invención, algunas veces se utiliza la expresión "ácido nucleico aislado". Esta expresión, cuando se aplica al ADN, se refiere a una molécula de ADN que está separada de las secuencias con las que está inmediatamente contigua (en las direcciones 5' y 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se origina. Por ejemplo, el "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN o ADNc insertada en un vector, tal como un plásmido o un vector vírico, o integrada en el ADN de un procarionte o eucariota.

Con respecto a las moléculas de ARN de la invención, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada tal como se ha definido anteriormente. Alternativamente, la expresión puede referirse a una molécula de ARN que se ha separado suficientemente de las moléculas de ARN con las que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos), de forma que esté presente en una forma "sustancialmente pura" (la expresión "sustancialmente pura" se define más adelante).

Con respecto a la proteína, la expresión "proteína aislada" o "proteína aislada y purificada" se utiliza algunas veces en la presente memoria. Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida por la expresión de una molécula de ácido nucleico aislada de la invención. Alternativamente, esta expresión puede referirse a una proteína que se ha separado suficientemente de otras proteínas con las que se asociaría de forma natural, para presentarse en forma "sustancialmente pura".

La expresión "región promotora" se refiere a las regiones reguladoras de la transcripción de un gen, que se pueden encontrar en el extremo 5' o 3' de la región de codificación, o dentro de la región de codificación, o dentro de los intrones.

El término "vector" se refiere a una pequeña molécula de ADN portadora en la que se puede insertar una secuencia de ADN para introducirla en una célula hospedadora en la que se replicará. Un "vector de expresión" es un vector especializado que contiene un gen o una secuencia de ácido nucleico con las regiones reguladoras necesarias para la expresión en una célula hospedadora.

La expresión "unido operativamente" significa que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de una secuencia de codificación se disponen en la molécula de ADN en las posiciones apropiadas con respecto a la secuencia de codificación para efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Esta misma definición se aplica a veces a la disposición de secuencias de codificación y elementos de control de la transcripción (por

ejemplo, promotores, potenciadores y elementos de terminación) en un vector de expresión. Esta definición también se aplica algunas veces a la disposición de secuencias de ácido nucleico de una primera y una segunda molécula de ácido nucleico en la que se genera una molécula de ácido nucleico híbrida.

5 La expresión "sustancialmente pura" se refiere a una preparación que comprende al menos el 50-60% en peso del compuesto de interés (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). De forma más preferida, la preparación comprende al menos el 75% en peso, y de forma más preferida el 90-99% en peso, del compuesto de interés. La pureza se mide mediante procedimientos apropiados para el compuesto de interés (por ejemplo, procedimientos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, análisis por HPLC y similares).

10 La frase "que consiste esencialmente en", cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos particular, significa una secuencia que tiene las propiedades de una SEQ ID NO:.. Por ejemplo, cuando se usa con referencia a una secuencia de aminoácidos, la frase incluye la secuencia de por sí y las modificaciones moleculares que no afectarían a las características básicas y novedosas de la secuencia.

15 El término "oligonucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cebadores y sondas, y se define como una molécula de ácido nucleico que consta de dos o más ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, preferentemente más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de varios factores y de la aplicación particular para la que se utiliza el oligonucleótido. El término "sonda", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido, polinucleótido o ácido nucleico, ya sea ARN o ADN, tanto de origen natural como en un producto de digestión con enzimas de restricción purificado o producido sintéticamente, que sea capaz de hibridarse o hibridarse específicamente con secuencias de ácido nucleico complementarias a la sonda. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. La longitud exacta de la sonda dependerá de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente de la sonda y el procedimiento de uso. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia objetivo, la sonda oligonucleotídica contiene típicamente 15-25 nucleótidos o más, aunque puede contener menos nucleótidos.

20 Las sondas del presente documento se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarias a diferentes cadenas de una secuencia de ácido nucleico diana particular. Esto significa que las sondas deben ser suficientemente complementarias para poder "hibridarse específicamente" o hibridarse con sus respectivas cadenas diana en un conjunto de condiciones predeterminadas. Por lo tanto, no es necesario que la secuencia de la sonda refleje la secuencia complementaria exacta de la diana. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario se puede unir al extremo 5' o 3' de la sonda, siendo el resto de la secuencia de la sonda complementaria a la cadena diana. Alternativamente, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en la sonda, siempre que la secuencia de la sonda tenga suficiente complementariedad con la secuencia del ácido nucleico diana para hibridarse específicamente con la misma.

30 La expresión "hibridarse específicamente" se refiere a la asociación entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias de secuencia lo suficientemente complementaria como para permitir dicha hibridación en condiciones predeterminadas generalmente utilizadas en la técnica (a veces denominadas "sustancialmente complementarias"). En particular, la expresión se refiere a la hibridación de un oligonucleótido con una secuencia sustancialmente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN monocatenaria de la invención, para la exclusión sustancial de la hibridación del oligonucleótido con ácidos nucleicos monocatenarios de secuencia no complementaria.

35 El término "cebador", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido, ya sea ARN o ADN, bicatenario o monocatenario, derivado de un sistema biológico, generado por digestión con enzimas de restricción, o producido sintéticamente que, cuando se dispone en el entorno adecuado es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de plantilla. Cuando se presenta con una plantilla de ácido nucleico apropiada, precursores adecuados de nucleósido trifosfato de ácidos nucleicos, una enzima polimerasa, cofactores adecuados y condiciones tales como una temperatura y un pH adecuados, el cebador puede extenderse en su extremo 3' mediante la adición de nucleótidos mediante la acción de una polimerasa o una actividad similar para producir un producto de extensión de cebador.

40 El cebador puede variar en longitud dependiendo de las condiciones particulares y los requerimientos de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, el cebador oligonucleotídico tiene típicamente una longitud de 15-25 nucleótidos o más. El cebador debe ser lo suficientemente complementario con la plantilla deseada para cebar la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, para poder hibridarse con la cadena de la plantilla deseada de una forma suficiente para proporcionar el resto hidroxilo 3' del cebador en una yuxtaposición apropiada para su uso en la iniciación de la síntesis mediante una polimerasa o enzima similar. No se requiere que la secuencia del cebador represente un complemento exacto de la plantilla deseada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria se puede unir al extremo 5' de un cebador por lo demás complementario. Alternativamente, pueden intercalarse bases no complementarias dentro de la secuencia del cebador oligonucleotídico, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena de plantilla deseada como para proporcionar funcionalmente un complejo de plantilla-

cebador para la síntesis del producto de extensión.

La expresión "porcentaje idéntico" se utiliza en la presente memoria con referencia a comparaciones entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos a menudo se comparan utilizando programas informáticos que alinean secuencias de nucleicos o aminoácidos, definiendo así las diferencias entre los dos. Para los fines de la presente invención, las comparaciones de secuencias de ácido nucleico se realizan utilizando el paquete GCG Wisconsin versión 9.1, disponible en Genetics Computer Group en Madison, Wisconsin. Por conveniencia, los parámetros predeterminados (penalización de creación de hueco = 12, penalización de extensión de hueco = 4) especificados por ese programa se destinan al uso en la presente memoria para comparar la identidad de secuencia. Alternativamente, el programa Blastn 2.0 proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (que se encuentra en Internet en [ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/)); Altschul et al., 1990, J Mol Biol 215: 403-410) que utiliza una alineación con huecos con parámetros predeterminados, puede utilizarse para determinar el nivel de identidad y similitud entre las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos.

## II. Preparación de moléculas de ácido nucleico que codifican FVIII variante y polipéptidos

### A. Moléculas de ácido nucleico

Pueden prepararse moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de FVIII variante de la invención utilizando procedimientos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de información de la secuencia de nucleótidos permite la preparación de moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención mediante una diversidad de medios. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido FVIII variante pueden aislarse de fuentes biológicas apropiadas usando protocolos estándar bien conocidos en la técnica.

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden mantenerse como ADN en cualquier vector de clonación conveniente. Los clones pueden mantenerse en un vector de expresión/clonación de plásmidos, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), que se propaga en una célula hospedadora de *E. coli* adecuada. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden mantenerse en un vector adecuado para la expresión en células de mamíferos. En los casos en los que la modificación postraduccional afecta a la función de la coagulación, se prefiere expresar la molécula en células de mamíferos.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican FVIII variante de la invención incluyen ADNc, ADN genómico, ARN, y también se describen en la presente memoria fragmentos de los mismos que pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente memoria oligonucleótidos (cadenas de ADN o ARN sentido o antisentido) que tienen secuencias capaces de hibridarse con al menos una secuencia de una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Dichos oligonucleótidos son útiles como sondas para detectar la expresión de FVIII.

### B. Proteínas

Un polipéptido FVIII con el dominio B eliminado de la presente invención se puede preparar de diversas maneras, según procedimientos conocidos. La proteína puede purificarse a partir de fuentes apropiadas, por ejemplo, células o tejidos cultivados bacterianos o animales transformados que expresan FVIII diseñado genéticamente mediante purificación por inmunoafinidad.

La disponibilidad de moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido FVIII variante permite la producción de FVIII utilizando procedimientos de expresión *in vitro* conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ADNc o un gen puede clonarse en un vector de transcripción *in vitro* apropiado, tal como pSP64 o pSP65, para la transcripción *in vitro*, seguida de traducción libre de células en un sistema de traducción libre de células adecuado, tal como germen de trigo o lisados de reticulocitos de conejo. Los sistemas de transcripción y traducción *in vitro* están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Promega Biotech, Madison, Wisconsin o BRL, Rockville, Maryland.

Alternativamente, pueden producirse mayores cantidades de FVIII por expresión en un sistema de expresión procariota o eucariota adecuado. Por ejemplo, parte o la totalidad de una molécula de ADN que codifica un factor VIII variante, por ejemplo, puede insertarse en un vector plasmídico adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli*, o una célula de mamífero tal como las células CHO o HeLa. Alternativamente, pueden generarse proteínas de fusión marcadas que comprenden FVIII. Dichas proteínas de fusión marcadas con FVIII están codificadas por parte o la totalidad de una molécula de ADN, ligada en el marco de lectura del codón correcto a una secuencia de nucleótidos que codifica una parte o la totalidad de una etiqueta polipeptídica deseada que se inserta en un vector plasmídico adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli*, o una célula eucariota, tal como, pero sin limitación, células de levadura y de mamífero. Vectores tales como los descritos anteriormente comprenden los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula hospedadora posicionados de tal forma que permitan la expresión del ADN en la célula hospedadora. Dichos elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción y secuencias potenciadoras.

Las proteínas FVIII variantes, producidas mediante expresión génica en un sistema procariota o eucariota recombinante pueden purificarse según procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema de expresión/secreción disponible comercialmente, con el que se expresa la proteína recombinante y después se secreta de la célula hospedadora, para purificarla fácilmente a partir del medio circundante. Si no se utilizan vectores de expresión/secreción, un enfoque alternativo implica la purificación de la proteína recombinante mediante separación por afinidad, tal como mediante interacción inmunológica con anticuerpos que se unen específicamente a la proteína recombinante o columnas de níquel para el aislamiento de proteínas recombinantes marcadas con 6-8 residuos de histidina en su extremo N-terminal o C-terminal. Etiquetas alternativas pueden comprender el epítipo FLAG, GST o el epítipo de hemaglutinina. Dichos procedimientos se utilizan de forma común por los expertos.

Las proteínas FVIII, preparadas mediante los procedimientos mencionados anteriormente, pueden analizarse según procedimientos estándar. Por ejemplo, dichas proteínas pueden evaluarse para determinar propiedades de coagulación alteradas según procedimientos conocidos.

Tal como se ha abordado anteriormente, una forma conveniente de producir un polipéptido según la presente invención es expresar el ácido nucleico que lo codifica, mediante el uso del ácido nucleico en un sistema de expresión. Una diversidad de sistemas de expresión de utilidad para los procedimientos de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En consecuencia, la presente invención comprende asimismo un procedimiento para producir un polipéptido (tal como se divulga), incluyendo el procedimiento la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido (generalmente ácido nucleico). Esto puede lograrse convenientemente cultivando una célula hospedadora, que contiene dicho vector, en condiciones apropiadas que causan o permiten la producción del polipéptido. Los polipéptidos también se pueden producir en sistemas *in vitro*.

### III. Utilizaciones de proteínas FVIII y ácidos nucleicos que codifican FVIII

Pueden utilizarse según la presente invención ácidos nucleicos de FVIII variante que codifican polipéptidos que tienen actividades de coagulación alteradas, por ejemplo, como agentes terapéuticos y/o profilácticos (proteína o ácido nucleico) que modulan la cascada de coagulación de la sangre o como un transgén en estrategias basadas en genes o en células para la expresión continua de FVIII y sus variantes en pacientes con hemofilia A. En el contexto de la presente invención se han descubierto modificaciones de moléculas de FVIII que dan como resultado un aumento de la actividad de coagulación y una mayor estabilidad, mejorando así la hemostasia.

#### A. Polipéptidos de FVIII variante

Los polipéptidos de FVIII variante pueden administrarse a un paciente mediante infusión en un vehículo biológicamente compatible, preferentemente mediante inyección intravenosa. El FVIII variante de la invención se puede encapsular opcionalmente en liposomas o mezclar con otros fosfolípidos o micelas para aumentar la estabilidad de la molécula. El FVIII se puede administrar solo o en combinación con otros agentes que se sabe que modulan la hemostasia (por ejemplo, factor V, factor Va o derivados de los mismos). Un profesional médico puede determinar una composición apropiada para administrar polipéptidos FVIII considerando una diversidad de variables fisiológicas, que incluyen, entre otras, la condición del paciente y el estado hemodinámico. Una diversidad de composiciones muy adecuadas para diferentes aplicaciones y vías de administración son bien conocidas en la técnica y se describen a continuación.

La preparación que contiene el análogo de FVIII purificado contiene una matriz fisiológicamente aceptable y preferentemente se formula como una preparación farmacéutica. La preparación se puede formular utilizando procedimientos sustancialmente conocidos de la técnica anterior, se puede mezclar con un tampón que contiene sales, tales como NaCl, CaCl<sub>2</sub>, y aminoácidos, tales como glicina y/o lisina, y en un intervalo de pH de 6 a 8. Hasta que sea necesario, la preparación purificada que contiene el análogo de FVIII se puede almacenar en forma de una solución terminada o en forma liofilizada o ultracongelada. Preferentemente, la preparación se almacena en forma liofilizada y se disuelve en una solución visualmente transparente utilizando una solución de reconstitución apropiada.

Alternativamente, la preparación según la presente invención también puede estar disponible como una preparación líquida o como un líquido que está ultracongelado.

La preparación según la presente invención es especialmente estable, es decir, se puede dejar reposar en forma disuelta durante un periodo prolongado antes de su administración.

La preparación según la presente invención puede estar disponible como una preparación farmacéutica con actividad de FVIII en forma de una preparación de un componente o en combinación con otros factores en forma de una preparación de múltiples componentes. Antes de procesar la proteína purificada en una preparación

farmacéutica, la proteína purificada se somete a los controles de calidad convencionales y se configura en una forma terapéutica de presentación. En particular, durante la fabricación recombinante, la preparación purificada se somete a ensayo para detectar la ausencia de ácidos nucleicos celulares y ácidos nucleicos que se derivan del vector de expresión, preferentemente utilizando un procedimiento tal como se describe en el documento EP 0 714 987.

La preparación de proteína farmacéutica se puede utilizar en dosis de entre 30 y 100 UI/kg (Una UI es de 100 ng/ml) en una sola inyección diaria o hasta 3 veces al día durante varios días. Los pacientes pueden tratarse inmediatamente después de su presentación en la clínica con una hemorragia. Alternativamente, los pacientes pueden recibir una infusión en embolada cada ocho a doce horas, o si se observa una mejoría suficiente, una infusión una vez al día del FVIII variante descrito en la presente memoria.

#### B. Ácidos nucleicos que codifican FVIII

Pueden utilizarse ácidos nucleicos que codifican FVIII para una diversidad de fines según la presente invención. Por ejemplo, se proporciona un vehículo de suministro de ácido nucleico (es decir, un vector de expresión) para modular la coagulación sanguínea, en el que el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVIII variante, o un fragmento funcional del mismo tal como se describe en la presente memoria. La administración de vectores de expresión que codifican FVIII a un paciente da como resultado la expresión del polipéptido FVIII que sirve para alterar la cascada de coagulación. Según la presente invención, una secuencia de ácido nucleico que codifica FVIII puede codificar un polipéptido FVIII tal como se describe en la presente memoria cuya expresión aumenta la hemostasia. Una secuencia de ácido nucleico de FVIII puede codificar una variante de polipéptido FVIII humano.

Los vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico de FVIII variante pueden administrarse solos, o en combinación con otras moléculas útiles para modular la hemostasia. Los vectores de expresión o la combinación de agentes terapéuticos pueden administrarse al paciente solos o en una composición farmacéuticamente aceptable o biológicamente compatible.

El vector de expresión que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican las variantes de FVIII variante puede ser un vector vírico. Los vectores víricos que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos (con o sin promotores/potenciadores específicos de tejido), vectores de virus adenoasociados (AAV) de múltiples serotipos (por ejemplo, AAV-1 a AAV-12 y otros) y vectores AAV híbridos, vectores de lentivirus y vectores de lentivirus pseudotipados [por ejemplo, virus del Ébola, virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus de inmunodeficiencia felina (VIF)], vectores del virus del herpes simple, vectores del virus vacuna, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores no víricos y otros.

También se proporcionan en la presente memoria procedimientos para la administración de un vector vírico que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un FVIII variante, o un fragmento funcional del mismo. Los vectores de AAV y los vectores lentivíricos tienen una amplia utilidad en los procedimientos descritos en la presente memoria y, preferentemente, no incluyen ningún gen vírico asociado con la patogénesis. De la forma más preferida, solo se incluyen las partes esenciales del vector, por ejemplo, los elementos ITR y LTR, respectivamente. La administración directa de vectores o la transducción *ex vivo* de células humanas y después de la infusión en el cuerpo dará como resultado la expresión de FVIII variantes, ejerciendo así un efecto terapéutico beneficioso sobre la hemostasia. En el contexto del factor VIII variante descrito en la presente memoria, dicha administración mejora la actividad de procoagulación.

Los vectores de AAV y lentivíricos recombinantes han encontrado una amplia utilidad para una diversidad de aplicaciones de terapia génica. Su utilidad para dichas aplicaciones se debe en gran parte a la alta eficacia de transferencia de genes *in vivo* lograda en una diversidad de contextos de órganos.

Pueden utilizarse partículas de AAV y lentivíricos como vehículos para la liberación eficaz de genes. Dichos viriones poseen una serie de características deseables para tales aplicaciones, incluido tropismo para dividir y no dividir células. La experiencia clínica inicial con estos vectores también ha demostrado que la toxicidad no sostenida y las respuestas inmunitarias eran mínimas o indetectables. Se sabe que los AAV infectan a una amplia diversidad de tipos de células *in vivo* e *in vitro* por endocitosis mediada por receptor o por transcitosis. Estos sistemas de vectores se han sometido a ensayo en humanos dirigiéndolos al epitelio retiniano, el hígado, el músculo esquelético, las vías aéreas, el cerebro, las articulaciones y células troncales hematopoyéticas. Es probable que los vectores no víricos basados en ADN plasmídico o minicírculos sean también vectores de transferencia génica adecuados para un gen grande como el que codifica FVIII.

Es deseable introducir un vector que pueda proporcionar, por ejemplo, múltiples copias de un gen deseado y, por lo tanto, mayores cantidades del producto de ese gen. Los vectores de AAV y lentivíricos mejorados y los procedimientos para producir estos vectores se han descrito en detalle en una serie de referencias, patentes y solicitudes de patentes, que incluyen: Wright J.F. (Hum Gene Ther 20: 698-706, 2009) que es la tecnología utilizada para la producción de vectores de grado clínico en nuestras instalaciones en el Children's Hospital of



Philadelphia. El vector lentiviral se puede producir en CHOP y los otros vectores están disponibles a través del laboratorio central de producción de vectores de lentivirus mediante el programa NHLBI Gene Therapy Resource Program (GTRP) - Lentivirus Vector Production Core Laboratory. Para algunas aplicaciones, un constructo de expresión puede comprender además elementos reguladores que sirven para dirigir la expresión en una célula o tipo de tejido particular. Dichos elementos reguladores son conocidos por los expertos en la materia y se tratan en profundidad por Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1992). La incorporación de elementos reguladores específicos de tejido en los constructos de expresión de la presente invención proporciona un tropismo de tejido al menos parcial para la expresión de los FVIII variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Por ejemplo, se pueden emplear secuencias de ácido nucleico que codifican el FVIII variante bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV) para la expresión del músculo esquelético o el hAAT-ApoE y otros para la expresión específica del hígado. También se pueden utilizar promotores específicos hematopoyéticos en vectores lentivíricos.

#### Procedimientos ejemplificativos para producir vectores de AAV

El AAV para la expresión génica recombinante se ha producido en la línea celular de riñón embrionario humano 293 y ha sido revisado recientemente por el Director de Clinical Vector Core en CHOP, Dr. J. F. Wright (Hum Gene Ther 20: 698-706,2009). En resumen, los vectores de AAV se construyen genéticamente a partir de AAV de tipo silvestre, un virus de ADN monocatenario que no es patógeno. El virus principal no es patógeno, los vectores tienen un amplio rango de huéspedes y pueden infectar tanto células en división como no en división. El vector se construye genéticamente a partir del virus eliminando los genes *rep* y *cap* y reemplazándolos por el transgén de interés bajo el control de un promotor específico. Para la preparación de AAV recombinante, el límite de tamaño superior de la secuencia que se puede insertar entre las dos ITR es de ~5.0 kb. Los plásmidos que expresan FIX canino o humano bajo el control del promotor/potenciador de CMV y un segundo plásmido que suministra funciones auxiliares de adenovirus junto con un tercer plásmido que contiene los genes *rep* y *cap* de AAV-2 se utilizaron para producir vectores AAV-2, mientras que un plásmido que contiene genes *cap* de AAV-1, AAV-6 o AAV-8 y el gen *rep* de AAV-2 e ITR se utiliza para producir los vectores de serotipo alternativo respectivos (Gao et al., (2002) Proc. Natl Acad. Sci. USA 99: 11854-11859; Xiao et al., (1999) J. Virol. 73: 3994-4003; Arruda et al., (2004) Blood 103: 85-92.). Los vectores de AAV se purifican mediante centrifugación en gradiente de densidad de CsCl repetida y el título de los vectores purificados se determina mediante hibridación de inmunotransferencia por puntos ("*dot-blot*") cuantitativa. Los vectores utilizados para experimentos en perros y ratones presentados en la presente memoria se prepararon por Vector Core en The Children's Hospital of Philadelphia.

En la presente memoria se describe asimismo un procedimiento para modular la hemostasia que comprende proporcionar células de un individuo con un vehículo de suministro de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVIII variante y permitir que las células crezcan en condiciones en las que se expresa el polipéptido FVIII.

A partir de la exposición anterior, se puede observar que los polipéptidos FVIII y vectores de ácido nucleico que expresan el polipéptido FVIII pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos asociados con una coagulación sanguínea anormal.

#### C. Composiciones farmacéuticas

Los vectores de expresión de la presente invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas que pueden administrarse a un sujeto para permitir la producción de una proteína biológicamente activa (por ejemplo, un polipéptido FVIII variante o un fragmento funcional o derivado del mismo) o para inducir la expresión continua del transgén del FVIII *in vivo* mediante tratamientos basados en genes y células o mediante la modificación *ex vivo* de las células del paciente o el donante. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden material genético suficiente para permitir que un receptor produzca una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido FVIII variante pueden influir en la hemostasia en el sujeto. Alternativamente, tal como se ha expuesto anteriormente, puede infundirse directamente una cantidad eficaz del polipéptido factor VIII variante en un paciente con necesidad de ello. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril, que incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solas, o en combinación con otros agentes (por ejemplo, cofactores) que influyen en la hemostasia.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo una respuesta inmunitaria perjudicial para el individuo que recibe la composición, y que se pueda administrar sin una toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. También pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes,

sustancias de amortiguación del pH y similares. Una discusión completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., 18ª edición, Easton, Pa. [1990]).

5 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como  
10 suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

15 La composición farmacéutica se puede proporcionar en forma de una sal y se puede formar con muchos ácidos, incluidos, pero sin limitación, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en agua u otros disolventes protónicos que las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o la  
20 totalidad de los siguientes: histidina 1-50 mM, 0.1%-2% de sacarosa y 2-7% de manitol, en un intervalo de pH de 4.5 a 5.5, que se combina con tampón antes de su uso.

Después de que se hayan preparado las composiciones farmacéuticas, se pueden disponer en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento. Para la administración de vectores o polipéptidos que contienen FVIII,  
25 dicho etiquetado incluiría la cantidad, la frecuencia y el procedimiento de administración.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin terapéutico deseado. La  
30 determinación de una dosis terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de la capacidad de un profesional médico utilizando las técnicas y la orientación proporcionadas en la presente invención. Las dosis terapéuticas dependerán, entre otros factores, de la edad y el estado general del sujeto, la gravedad del fenotipo anormal de coagulación sanguínea y la fuerza de las secuencias de control que regulan los niveles de expresión del polipéptido FVIII variante. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz en seres humanos se encontrará en un intervalo relativamente amplio que puede determinar un médico basándose en la respuesta de un paciente  
35 individual al tratamiento con FVIII basado en vectores.

#### D. Administración

Los polipéptidos del factor VIII variante, solos o en combinación con otros agentes, pueden infundirse  
40 directamente en un paciente en un vehículo biológico apropiado tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Los vectores de expresión de la presente invención que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican FVIII variante, o fragmentos funcionales del mismo, pueden administrarse a un paciente mediante una diversidad de medios (véase a continuación) para lograr y mantener un nivel profilácticamente y/o  
45 terapéuticamente eficaz del polipéptido FVIII. Un experto en la materia podría determinar fácilmente protocolos específicos para utilizar los vectores de expresión que codifican FVIII de la presente invención para el tratamiento terapéutico de un paciente particular. Los protocolos para la generación de vectores adenovíricos y la administración a pacientes se han descrito en las patentes US nº 5.998.205; 6.228.646; 6.093.699; 6.100.242; y las solicitudes internacionales de patente nº WO 94/17810 y WO 94/23744.

50 Los vectores adenovíricos que codifican FVIII variante de la presente invención puede administrarse a un paciente por cualquier medio conocido. La administración directa de las composiciones farmacéuticas *in vivo* generalmente se puede realizar mediante inyección utilizando una jeringa convencional, aunque están previstos otros procedimientos de administración, tales como la administración potenciada por convección (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.720.720). En este sentido, las composiciones pueden administrarse por vía  
55 subcutánea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intraorbital, intramucosa, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, oral, intrahepática o intramuscular. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Un médico especializado en el tratamiento de pacientes con trastornos de la coagulación de la sangre puede determinar la ruta óptima para la administración de los vectores adenovíricos que comprenden secuencias de ácido nucleico de FVIII en función de varios criterios,  
60 entre los que se incluyen, pero de manera no limitativa: el estado del paciente y el propósito del tratamiento (por ejemplo, aumento o reducción de la coagulación sanguínea).

La presente invención comprende asimismo unos vectores de AAV que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVIII variante.

65 También se proporcionan vectores de lentivirus o de lentivirus pseudotipado que comprenden una secuencia de

ácido nucleico que codifica un polipéptido FVIII variante.

Se incluyen asimismo unos plásmidos desnudos o vectores de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVIII variante.

5 Los materiales y procedimientos siguientes se proporcionan para facilitar la puesta en práctica del ejemplo I.

#### Purificación de FVIII-BDD canino y humano:

10 Se introdujeron unos plásmidos que codifican hFVIII-BDD o cFVIII-BDD en células de riñón de hámster recién nacido (BHK) y se establecieron clones estables de alta producción tal como se describe utilizando técnicas estándar (Toso et al. (2004) J. Biol. Chem. 279: 21643-21650). Las células se expandieron en matraces triples y se cultivaron en medio DMEM/F12 (sin rojo fenol) suplementado con ITS, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM y 1.0 mg/ml de Albumax (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se generaron variantes de FVIII que contenían sustituciones de aminoácidos utilizando mutagénesis dirigida al sitio. Los medios acondicionados se recogieron diariamente durante 4-6 días, se centrifugaron y se añadieron inhibidores (APMSF 10 µM y benzamidina 1 mM). Para la purificación, los medios se procesaron diariamente y se cargaron en una columna SP-SepharoseFF de ~70 ml (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) equilibrada con MES 20 mM, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 0.01% de Tween-80, pH 6.8. La columna se lavó con el mismo tampón y se eluyó con MES 20 mM, NaCl 0.65 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 0.01% de Tween-80, pH 6.8. Las fracciones que contenían cFVIII-BDD (supervisadas mediante un ensayo de coagulación) se almacenaron a -80°C. Después de sucesivas ejecuciones diarias de la columna SP-Sepharose, todas las fracciones que contenían actividad se agruparon y se diluyeron con MES 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 5 mM/Tween-80 al 0.01%, pH 6.8, y después se cargaron en una columna Poros HS/20 (10 x 100 mm; Applied Biosystems, Foster City, CA) equilibrada con el mismo tampón. La columna se lavó con MES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 6.0, y después se eluyó con un gradiente de NaCl 0-1.0 M. Las fracciones que contenían cFVIII-BDD se agruparon y después se diluyeron con HEPES 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4, y después se cargaron en una columna Poros HQ/20 (4.6 x 100 mm; Applied Biosystems, Foster City, CA) equilibrada con el mismo tampón. La columna se lavó con HEPES 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4 y después se eluyó con un gradiente de NaCl 0-65 M. Las fracciones que contenían actividad se dializaron frente a Hepes 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7.4, durante 2 horas y la proteína se almacenó a -80°C en partes alícuotas pequeñas.

La actividad específica de la proteína se determinó mediante el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) con modificaciones secundarias (12). El decaimiento de la actividad de FVIII activado se supervisó mediante un ensayo de componentes purificados utilizando el complejo Xasa de factor humano reconstituido y los modelos de plasma descritos anteriormente (11). La secuenciación N-terminal se determinó en el laboratorio del Dr. Alexander Kurosky y el Dr. Steven Smith en UTMB (Galveston, TX). La escisión enzimática de glucanos unidos a N se llevó a cabo utilizando N-glicosidasa F recombinante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) tal como se expuso anteriormente (13).

#### ELISA antigénico de cFVIII-BDD

Se utilizó La proteína cFVIII-BDD para la generación de una serie de anticuerpos policlonales anti-cFVIII-BDD de conejo y anti-cFVIII monoclonales murinos (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT) (ver la figura 1). Los anticuerpos anti-cFVIII se detectaron mediante el ensayo Bethesda (14) o mediante anticuerpos IgG específicos de cFVIII por ELISA. Un anticuerpo monoclonal para la cadena ligera (clon 2C4.1C3) o cadena pesada (clon 4B1.2C8) para capturar la proteína (2 µg/ml) seguido de un anticuerpo policlonal de conejo anti-cFVIII-BDD como anticuerpo secundario (2 µg/ml). El cFVIII-BDD se detectó con un anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante a una dilución de 1:15,000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). La curva estándar se generó utilizando una dilución seriada de cFVIII-BDD recombinante. La semividua y la recuperación se calcularon tal como se ha descrito anteriormente (15, 16).

#### ELISA de IgG específica anti-cFVIII

Se utilizó ELISA para detectar anticuerpos IgG específicos de cFVIII utilizando proteína cFVIII-BDD purificada (1 µg/ml) para capturar anticuerpos IgG1 o IgG2 en suero de perro. Se utilizó suero de referencia canino (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX) con concentraciones conocidas de IgG1 e IgG2 como patrón mediante recubrimiento con diluciones seriadas del suero canino. Las muestras de suero canino se diluyeron en tampón de LowCross (Candor Bioscience GmbH, Alemania). La IgG se detectó con IgG1 anti-canina de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante o IgG2 anti-canina de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX) diluida 1:1000 en tampón de LowCross (Candor, Bioscience GmbH, Weissensberg, Alemania).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas formas de realización de la invención. No pretenden limitar la invención de ningún modo.

65

**Ejemplo 1****El FVIII con el dominio B eliminado canino recombinante muestra una actividad específica alta y es seguro en el modelo A de hemofilia canina**

5 Utilizando sistemas de expresión idénticos, encontramos que cFVIII-BDD proporciona típicamente 0.5 mg/l, que es una cantidad 3 veces más alta que hFVIII-BDD (0.16 mg/l). En particular, el cFVIII-BDD purificado existía predominantemente como una proteína monocatenaria (> 75% del total), mientras que, como se esperaba, el hFVIII-BDD era principalmente un heterodímero (figura 2A, B). La secuencia de reconocimiento de aminoácidos para el PACE/furina en cFVIII (HHQR) (17) difiere del FVIII humano y porcino (RHQR) y puede explicar la forma monocatenaria predominante de cFVIII (17). Después del tratamiento con trombina, el cFVIII-BDD se activó adecuadamente y no se observaron diferencias importantes entre hFVIII-BDD y cFVIII-BDD (figura 2B). El patrón de migración del dominio A1 difiere entre las dos especies de FVIII. No obstante, la eliminación del glicano unido a N dio como resultado una migración similar de los dominios A1 (datos no mostrados). Estos datos indican que la estructura de glicosilación en los dominios A1 es diferente o que posiblemente solo un sitio en el dominio A1 humano esté glicosilado. Además, la secuenciación N-terminal de la banda relevante produce los resultados esperados (datos no mostrados). Usando un aPTT de una etapa, la actividad específica de cFVIII-BDD ( $33,926 \pm 675$  U/mg) fue ~3 veces mayor que la de hFVIII-BDD ( $12,345 \pm 787$  U/mg) ( $p < 0.001$ ). Se obtuvieron hallazgos similares después de la activación de trombina de FVIII canino y humano en el aPTT de dos etapas ( $756,754 \pm 60,592$  frente a  $343,066 \pm 2090$  U/mg,  $p < 0.003$ ) proporcionando un cociente de activación (AQ) de 28 y 22 para humanos y caninos, respectivamente (figura 2, panel C). Normalmente, un AQ bajo representa la contaminación con formas activadas de la proteína y da como resultado una falsa actividad de proteína elevada. Estos hallazgos fueron coherentes utilizando tres preparaciones separadas de cFVIII-BDD. Tomados en conjunto, estos datos utilizando la proteína FVIII purificada apoyan las conclusiones de que el cFVIII tiene una actividad específica intrínseca elevada.

Después de la activación, el FVIIIa pierde rápidamente la actividad debido a la disociación del dominio A2 del heterotrímero A1/A2/A3-C1-C2. El cFVIII-BDD o el hFVIII-BDD purificados se activaron rápidamente (~30 s) con trombina y la actividad residual del cofactor se supervisó con respecto al tiempo. Utilizando un ensayo de componente purificado (figura 2, panel D) o un ensayo de coagulación (datos no mostrados), encontramos que la semivida de cFVIII era 3 veces más prolongada que la de hFVIII. Estos hallazgos sugieren que cFVIIIa muestra una afinidad aumentada por el dominio A2 en comparación con hFVIIIa. Si bien estos datos podrían, en parte, explicar la alta actividad específica del cFVIII, tanto el FVIII-BDD porcino (17) como el murino (11) tienen también una mayor estabilidad del dominio A2 en comparación con el hFVIII, pero aparentemente tienen una actividad específica equivalente al hFVIII. Por lo tanto, es posible que la mayor actividad específica de cFVIII sea debida a la proteína monocatenaria con una mayor estabilidad.

Para evaluar la eficacia y la seguridad del cFVIII-BDD, inyectamos HA a una serie de perros adultos y neonatos. En estos perros, no se detectó antígeno de FVIII circulante, lo que es coherente con los humanos con la mutación análoga de FVIII. En perros normales, los niveles de cFVIII son 80-130 ng/ml, que es comparable a los niveles humanos (100-200 ng/ml) y a los niveles de cFVIII descritos anteriormente (18).

Los perros HA recibieron cFVIII-BDD en dosis de 2.5 µg/kg cada 30 días durante 2-4 meses y se recogieron muestras seriadas de plasma hasta cuatro semanas después de cada inyección de proteína. El cFVIII-BDD fue funcional como lo demuestra el acortamiento del tiempo de coagulación de la sangre completa (WBCT) y el aumento de la actividad de coagulación del cFVIII (figura 3). La recuperación de la proteína medida a los 5-10 minutos ( $n = 5$  infusiones) después de la inyección fue excelente, alcanzando niveles del  $71.8\% \pm 9.2\%$ . Hubo una buena correlación entre la actividad de cFVIII y los niveles de antígeno (figura 3B). Los niveles de cFVIII disminuyeron lentamente después de la infusión y volvieron a los valores de referencia dentro de un periodo de 48 a 56 horas con una semivida calculada de 12 a 14 horas. No hubo toxicidad local o sistémica ni evidencia de activación patológica de coagulación. Conjuntamente, estos datos demuestran que el cFVIII-BDD es seguro y eficaz para inducir hemostasia sostenida *in vivo* y tiene una semivida de proteína comparable a la farmacocinética de hFVIII-BDD en perros HA y a partir de la experiencia clínica en humanos (19).

El uso de estos perros HA inmunocompetentes no consanguíneos proporciona un modelo ideal para analizar la inmunogenicidad de la proteína cFVIII-BDD tanto en perros recién nacidos sin tratamiento previo como en adultos previamente expuestos al cFVIII derivado del plasma. Estos perros no desarrollan anticuerpos contra cFVIII tras la infusión de cFVIII derivado de plasma. A este respecto, en perros adultos, no se detectaron anticuerpos contra cFVIII-BDD mediante el ensayo Bethesda o IgG específicas de cFVIII después de la exposición repetitiva a la proteína (figura 3C). Además, los perros recién nacidos ( $n = 3$ ) expuestos exclusivamente a cFVIII-BDD o pequeñas cantidades de FVIII derivado de plasma ( $n = 2$ ) tampoco desarrollaron anticuerpos contra cFVIII. En un perro HA con un inhibidor del cFVIII derivado de plasma, los títulos de inhibidor de 4 B.U. corresponden a 3000-4000 ng/ml de IgG2. Estos datos contrastan con las fuertes respuestas inmunitarias de los perros adultos con HA contra hFVIII caracterizadas por anticuerpos de larga duración contra hFVIII después de la exposición a la proteína o después de la administración del gen hFVIII o los tratamientos basados en células (1, 16, 19, 20). Por lo tanto, el cFVIII-BDD no presenta inmunogenicidad en este modelo

pivotal de perros HA, que es esencial para determinar la eficacia y la seguridad a largo plazo de nuevas estrategias terapéuticas para HA.

5 Intentamos comparar las tasas de inactivación de cFVIII-BDD con hFVIII-BDD en plasma humano que contiene inhibidores de FVIII. La recuperación de cFVIII después de la incubación con inhibidores fue el 40-45% más alta que hFVIII (ver la figura 4). La mayor supervivencia de cFVIII en presencia de inhibidores humanos apoya aún más la investigación de cFVIII como una posible estrategia de derivación para la hemofilia.

10 La expresión recombinante de cFVIII-BDD nos permitió generar grandes cantidades de proteína (> 20 mg), desarrollar anticuerpos valiosos y comenzar a desentrañar las propiedades intrínsecas de la proteína que pueden afectar al desarrollo del tratamiento contra la hemofilia. La actividad biológica mejorada de cFVIII podría ser consecuencia parcialmente de la secreción de cFVIII como una proteína monocatenaria y las variantes de hFVIII con sitios de escisión de PACE/furina caninos pueden ayudar a definir si estas modificaciones mejorarían la producción y la estabilidad de la proteína recombinante. Además, un análisis detallado del conjunto del complejo Xasa en la caracterización cinética con FVIIIa canino arrojará luz sobre su aparente actividad específica aumentada en comparación con hFVIII.

20 Los datos de eficacia y seguridad de los estudios en perros HA no propensos a inhibidores demuestran que cFVIII-BDD es una opción atractiva para el tratamiento de hemorragias y para la prevención en perros durante procedimientos complejos o invasivos. La capacidad para detectar anticuerpos IgG no neutralizantes, además de anticuerpos neutralizantes, proporciona la oportunidad de dilucidar hallazgos conflictivos en el tratamiento basado en células o genes en estos perros (21-24). Una caracterización fenotípica más completa de los perros con HA es ahora factible y mejora aún más la relevancia de los estudios preclínicos para una nueva generación de tratamientos basados en genes y en células para la hemofilia.

25

## Ejemplo 2

### Generación de FVIII humano y canino mutante con sitios de escisión PACE-furina modificados.

30 Utilizando las mismas técnicas descritas anteriormente, se generó BDD-FVIII humano con las proteínas WT y R1645H mutante. Los productos purificados se sometieron a una SDS-PAGE. La secuencia de reconocimiento de aminoácidos del FVIII canino para la escisión intracelular por PACE/furina (HHQR) difiere de la del FVIII humano y porcino (**RHQ**R). Analizamos el posible papel de este sitio de escisión en la estabilidad y la actividad aumentadas de la cadena sencilla de cFVIII. Las sustituciones simples de R → H en FVIII humano y H → R en una posición homóloga en FVIII canino dieron como resultado un cambio de ~2-3 veces en la relación de FVIII monocatenario a escindido en el material secretado en la dirección anticipada. Ver la figura 5. Además, el hFVIII<sup>R1645H</sup> activado tuvo un aumento de 3 veces en su semivida en comparación con hBFVIII WT. Ver la figura 6. En particular, en la figura 6, la disociación del dominio A2 del FVIII R1645H humano mutante es similar a la del cFVIII de tipo silvestre y el FVIII porcino. Estos estudios sugieren que una única sustitución de aminoácidos en la posición 1645 mejora la actividad de la función biológica del FVIII humano.

40

### Efectos de la variante del FVIII humano R1650H en microcirculación y macrocirculación.

45 Como se expone anteriormente, el FVIII canino tiene una mayor actividad, en parte debido a su mayor estabilidad, ya que se expresa predominantemente como una sola cadena, probablemente involucrando una sola sustitución R1650H (RH) en el sitio PACE/furina en cFVIII. Los estudios de pFVIII de Lenti/BMT que expresan phBFVIIIIRH mostraron que la variante de FVIII que contenía esta sustitución de aminoácido y la eliminación del dominio B se expresaba a niveles comparables a los observados en ratones A con hemofilia transgénica que expresaban FVIII humano de tipo silvestre. Además, la variante de FVIII fue más eficaz en varios modelos de hemorragia, incluyendo hemostasias casi normales en el modelo de lesión por láser en cremáster (microcirculación) o en el modelo de arteria carótida (macrocirculación) en ratones receptores de hemofilia A. Ver la figura 7. Este es el primer ratón HA que expresa lenti/BMT pFVIII con hemostasia casi normal. Los conteos preliminares de megacariocitos y estudios de apoptosis muestran que phBFVIIIIRH no es perjudicial para los megacariocitos tal como se observó por otros cuando se expresó FVIII de tipo silvestre en estas células. Estos estudios proporcionan información nueva e importante sobre la eficacia de pF8 para el tratamiento de la hemofilia A.

55

60 La variante de hFVIII 1645H muestra una mayor estabilidad debido a la lenta disociación del dominio A2. En consecuencia, esta variante se puede utilizar para aprovechar la lesión tisular con el fin de mejorar la generación y la duración de la formación de coágulos, proporcionando así una hemostasia más eficaz. Las alteraciones adicionales del sitio de escisión PACE-furina deberían producir variantes de FVIII resistentes similares. Dichas alteraciones incluyen, sin limitación, la eliminación de uno o más aminoácidos dentro del sitio de escisión y la sustitución de la R en la secuencia humana por un aminoácido tal como serina, lisina, metionina, cisteína, prolina y tirosina. En segundo lugar, cualquiera de estas variantes será útil para combinar con otras formas de FVIII, incluyendo, sin limitación, IR8 que es resistente a la inactivación por la proteína C activada. Esta combinación del hFVIII 1645 (u otras formas de resistencia a PACE-furina) con la variante IR8 puede mejorar aún más la eficacia

65

del FVIII para inducir la hemostasia. Finalmente, el producto proteico descrito en la presente memoria también podría utilizarse para la pegilación específica de sitio destinada a aumentar la semivida de la proteína o encapsularse con varios compuestos para mejorar la eficacia mientras se mantienen los parámetros de seguridad apropiados.

5

La(s) variante(s) de FVIII que mejor funcionan se utilizarán para (a) la producción de proteínas para el tratamiento de la hemorragia, ya sea de forma preventiva o en respuesta a una hemorragia, (b) en transgenes para el suministro directo de genes por vectores víricos o no víricos al hígado, músculo esquelético o piel. Además, estos vectores y vectores retrovíricos, lentivíricos pueden emplearse para dirigirse a células troncales hematopoyéticas para la expresión en células de la médula ósea. También se pueden utilizar para dirigir la expresión de FVIII variantes en células progenitoras inducidas (iPS) o células troncales embrionarias humanas o no humanas. Dichas células se pueden transducir *ex vivo* y después devolverse al paciente mediante una inyección intravenosa o local, siempre que no se modifique la identidad genética de la línea germinal del ser humano. En un enfoque, las células se derivan del paciente. En otro, las células pueden obtenerse de un donante inmunológicamente compatible.

10

15

### Referencias

20

1. Nichols TC, Dillow AM, Franck HW, et al. Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia A, hemophilia B, von Willebrand disease, and factor VII deficiency. *Ilar J.* 2009;50:144-167.

25

2. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene as a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet.* 1993;5:236-241.

30

4. Lozier JN, Dutra A, Pak E, et al. The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:12991-12996.

35

5. Cameron C, Notley C, Hoyle S, et al. The canine factor VIII cDNA and 5' flanking sequence. *Thromb Haemost.* 1998;79:317-322.

6. Viel KR, Ameri A, Abshire TC, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med.* 2009;360:1618-1627.

40

7. Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood.* 2004;103:1253-1260.

8. Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM, Lenting PJ, Zheng XL. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7416-7421.

45

9. Kaufman RJ, Davies MV, Wasley LC, Michnick D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4485-4490.

50

10. Toso R, Camire RM. Removal of B-domain sequences from factor V rather than specific proteolysis underlies the mechanism by which cofactor function is realized. *J Biol Chem.* 2004;279:21643-21650.

11. Doering C, Parker ET, Healey JF, Craddock HN, Barrow RT, Lollar P. Expression and characterization of recombinant murine factor VIII. *Thromb Haemost.* 2002;88:450-458.

55

12. Lollar P, Parker ET, Fay PJ. Coagulant properties of hybrid human/porcine factor VIII molecules. *J Biol Chem.* 1992;267:23652-23657.

13. Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, et al. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood.* 2001;97:130-138.

11

60

14. Herzog RW, Mount JD, Arruda VR, High KA, Lothrop CD, Jr. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther.* 2001;4:192-200.

65

15. Brinkhous KM, Sandberg H, Garris JB, et al. Purified human factor VIII procoagulant protein: comparative hemostatic response after infusions into hemophilic and von Willebrand disease dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:8752-8756.

- 5
16. Brinkhous KM, Hedner U, Garris JB, Diness V, Read MS. Effect of recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:1382-1386.
17. Doering CB, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII. J Biol Chem. 2002;277:38345-38349.
- 10
18. Shibata M, Rowle F, Labelle A, et al. Characterization of recombinant canine FVIII and quantitative determination of factor FVIII in canine plasma. J Thromb Haemost. 2005;3:P0033.
19. Brinkhous K, Sandberg H, Widlund L, et al. Preclinical pharmacology of albumin-free Bdomain deleted recombinant factor VIII. Semin Thromb Hemost. 2002;28:269-272.
- 15
20. Connelly S, Mount J, Mauser A, et al. Complete short-term correction of canine hemophilia A by *in vivo* gene therapy. Blood. 1996;88:3846-3853.
21. Brown BD, Shi CX, Powell S, Hurlbut D, Graham FL, Lillicrap D. Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A. Blood. 2004;103:804-810.
- 20
22. Chuah MK, Schiedner G, Thorrez L, et al. Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. Blood. 2003;101:1734-1743.
- 25
23. Jiang H, Lillicrap D, Patarroyo-White S, et al. Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. Blood. 2006;108:107-115.
- 30
24. McCormack WM, Jr., Seiler MP, Bertin TK, et al. Helper-dependent adenoviral gene therapy mediates long-term correction of the clotting defect in the canine hemophilia A model. J Thromb Haemost. 2006;4:1218-1225.

35

Aunque se han descrito y ejemplificado específicamente anteriormente algunas de las formas de realización preferidas de la presente invención, no se pretende que la invención se limite a dichas formas de realización. Se pueden introducir varias modificaciones a la misma sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención, tal como se establece en las reivindicaciones siguientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Variante de factor VIII humano (FVIII) que modula la hemostasia, en la que dicha variante
  - 5 (i) carece de la mayor parte del dominio B, comprende una sustitución de aminoácido R1645H en el sitio de escisión PACE/FURINA y presenta unas actividad específica y estabilidad aumentadas con respecto al FVIII humano con el dominio B eliminado (BDD) que carece de dicha sustitución;
  - 10 (ii) es la variante de (i) que comprende unas eliminaciones y modificaciones adicionales respecto al sitio de escisión PACE/FURINA y presenta un aumento de 3 veces en la actividad específica y una estabilidad mejorada en comparación con el FVIII humano con el dominio B eliminado (BDD) que carece de dicha sustitución; o
  - 15 (iii) presenta una eliminación de uno o más de los aminoácidos RHQR en el sitio de escisión PACE/FURINA.
2. Ácido nucleico que codifica la variante de FVIII según la reivindicación 1.
3. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 2.
- 20 4. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 3.
5. Composición farmacéutica que comprende la variante de factor VIII según la reivindicación 1 en un vehículo biológicamente compatible.
- 25 6. Vector según la reivindicación 3, seleccionado de entre el grupo que consiste en un vector adenovírico, un vector asociado a adenovirus, un vector retrovírico, un plásmido y un vector lentivírico.
7. Variante de factor VIII humano según la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento de un trastorno relacionado con la hemostasia, en un vehículo biológicamente aceptable, en la que dicha variante presenta una actividad específica y una estabilidad aumentadas con respecto al FVIII-BDD humano que carece de dicha sustitución y eliminaciones.
- 30 8. Variante de factor VIII humano para su utilización según la reivindicación 7, en la que dicha variante es un procoagulante y dicho trastorno es seleccionado de entre el grupo que consiste en hemofilia A, enfermedades de von Willebrand y hemorragia asociada con traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, accidente cerebrovascular, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC) y trastornos del tratamiento de sobreanticoagulación.
- 35 9. Variante de factor VIII humano para su utilización según la reivindicación 7 o 8, en la que dicha variante está encapsulada en un liposoma o mezclada con fosfolípidos o micelas.
- 40



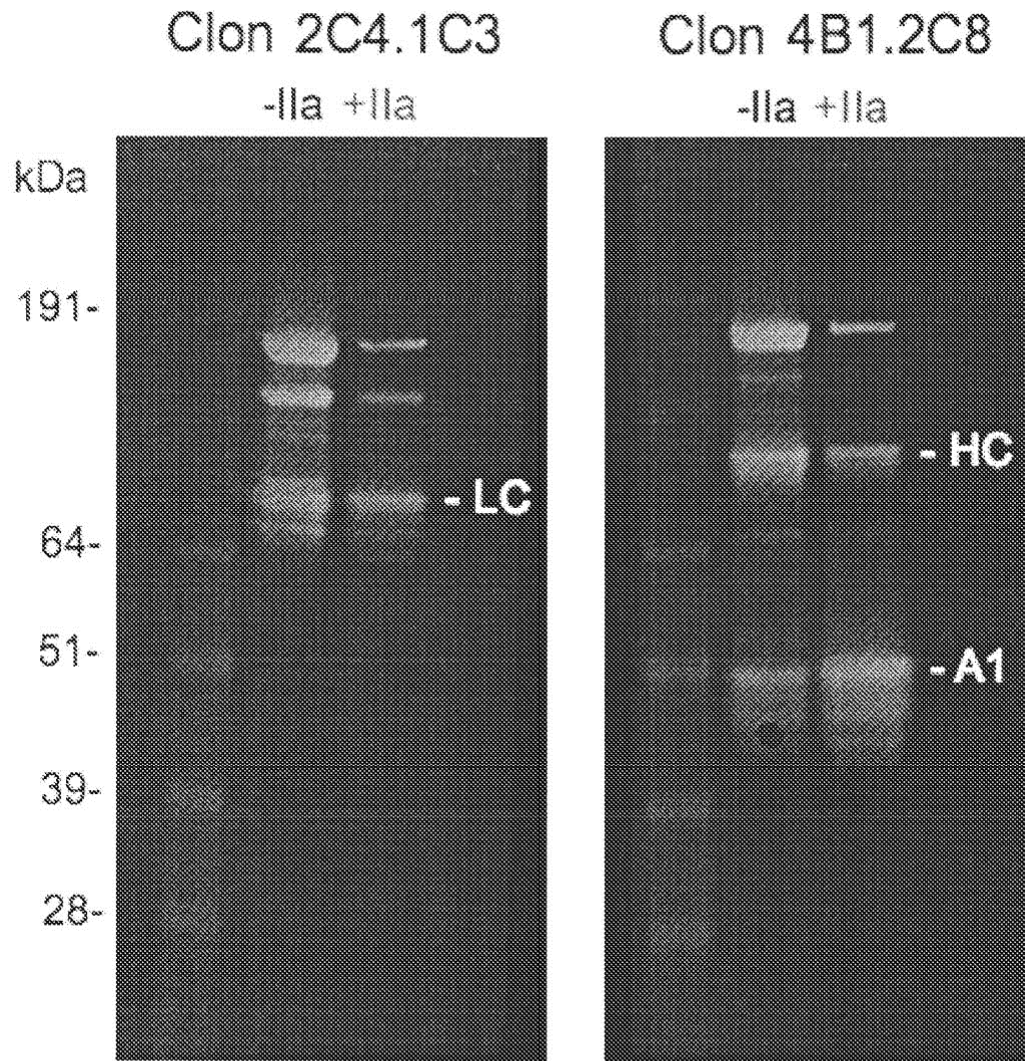
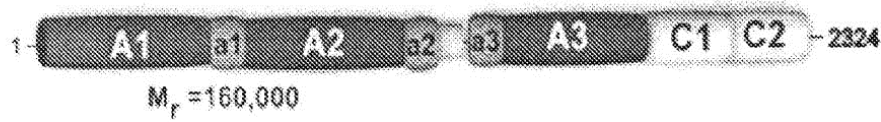
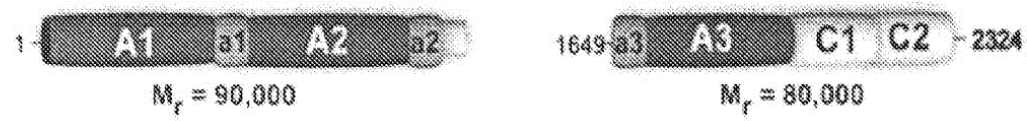


Figura 1

cFVIII-BDD (monocatenario)



cFVIII-BDD (bicatenario)



cFVIIIa

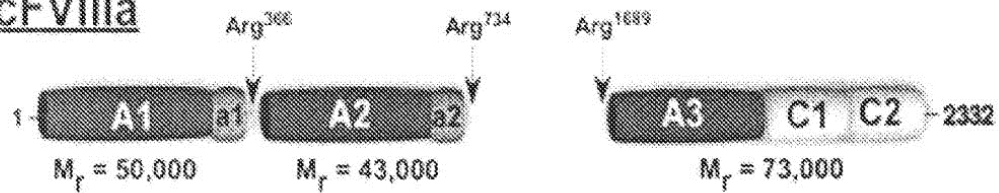
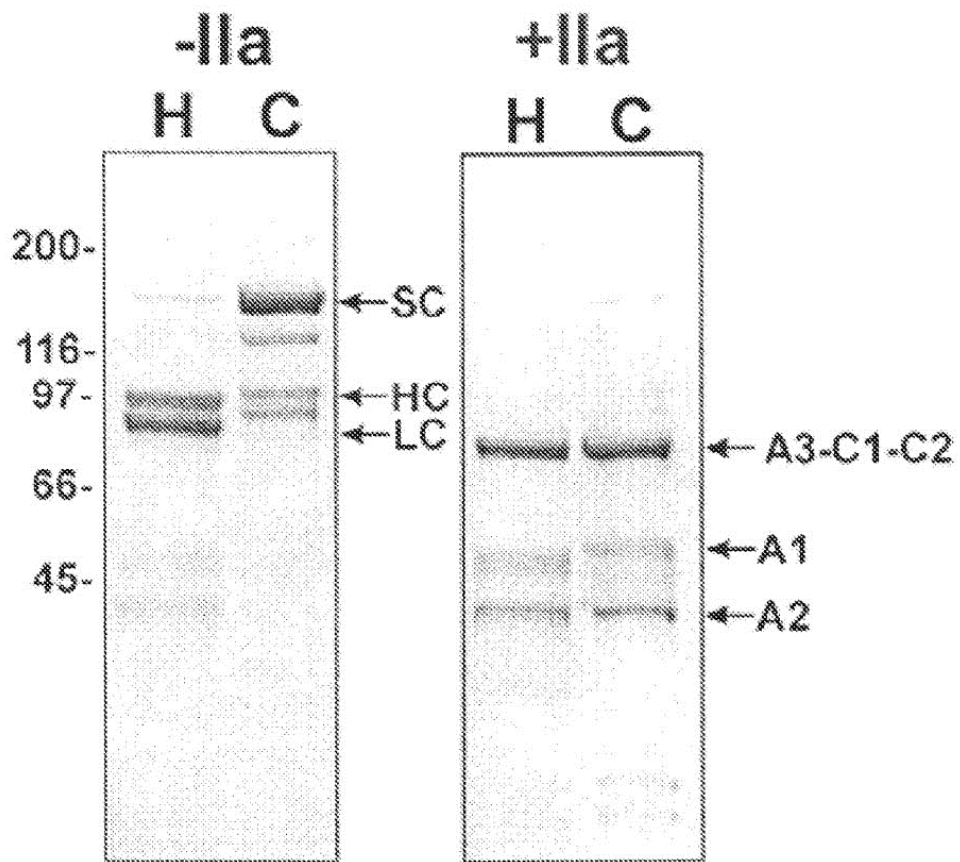


Figura 2A



**Figura 2B**

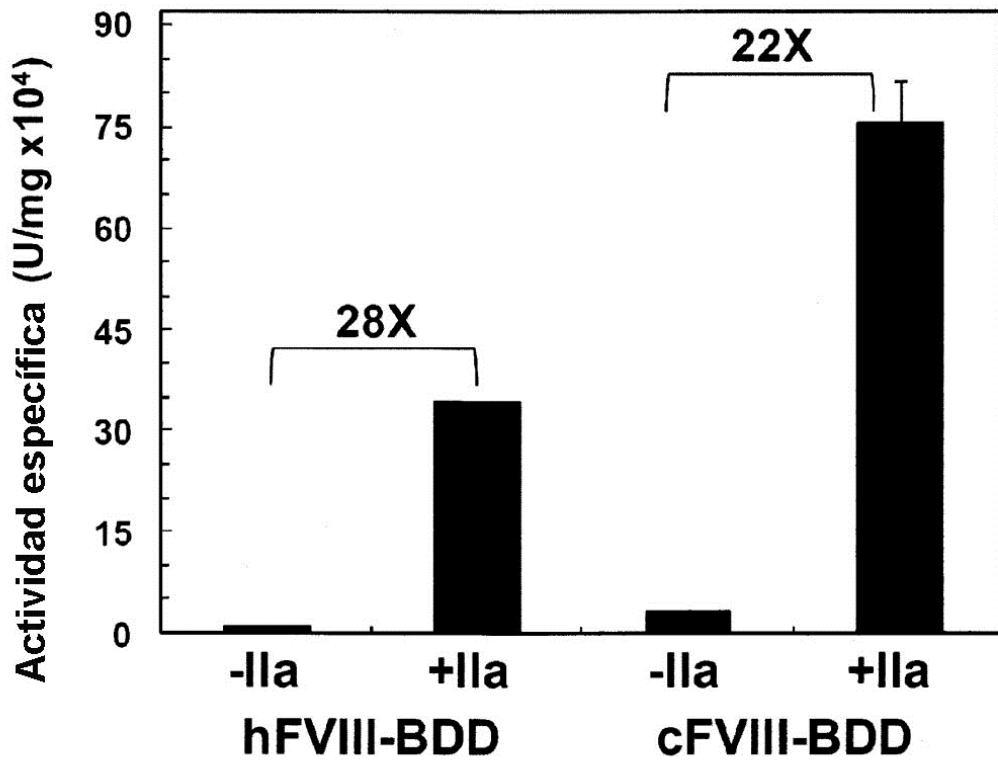


Figura 2C

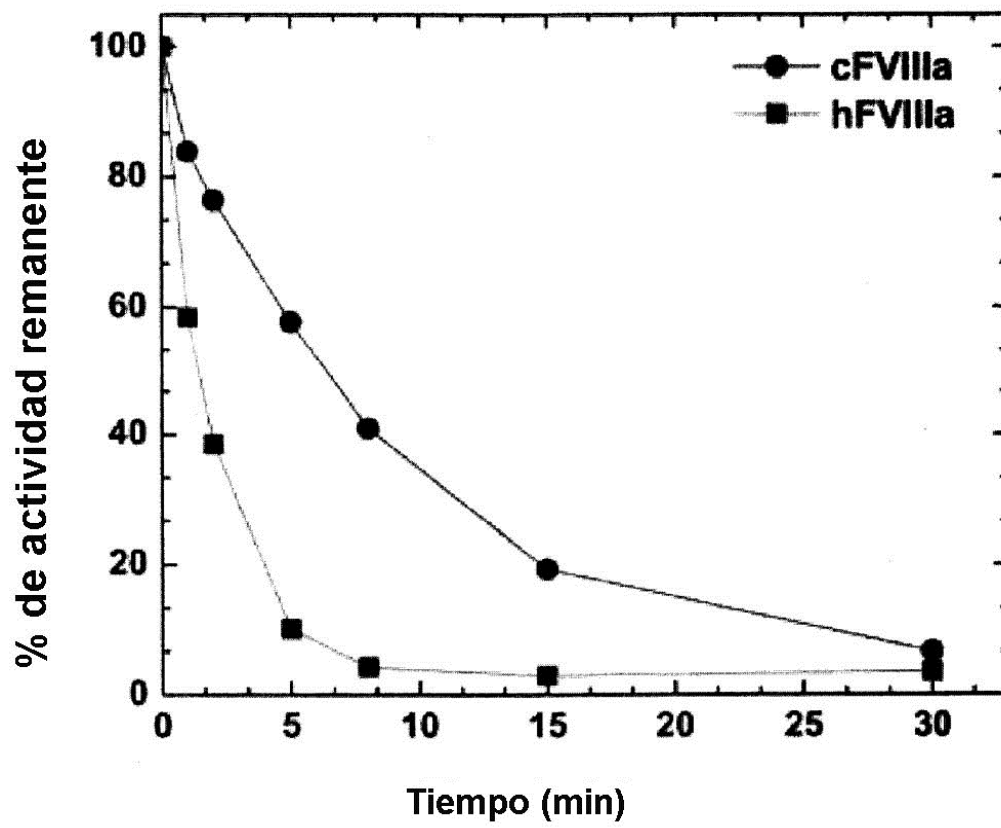


Figura 2D

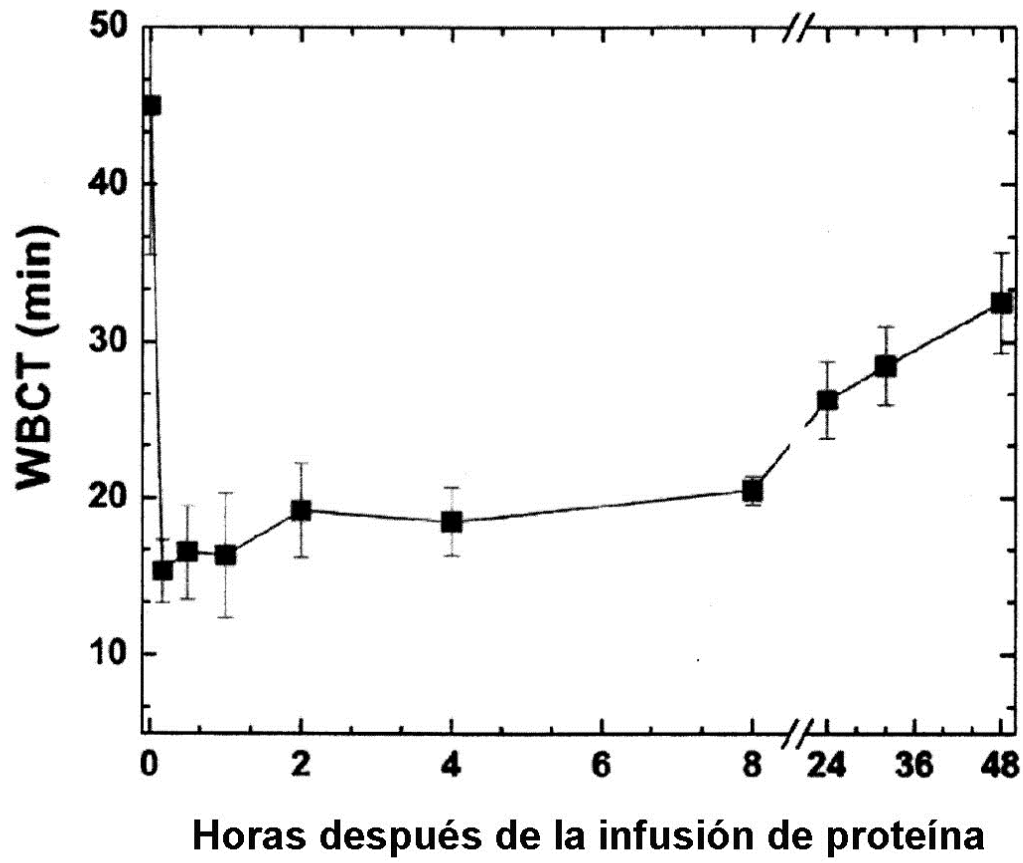


Figura 3A

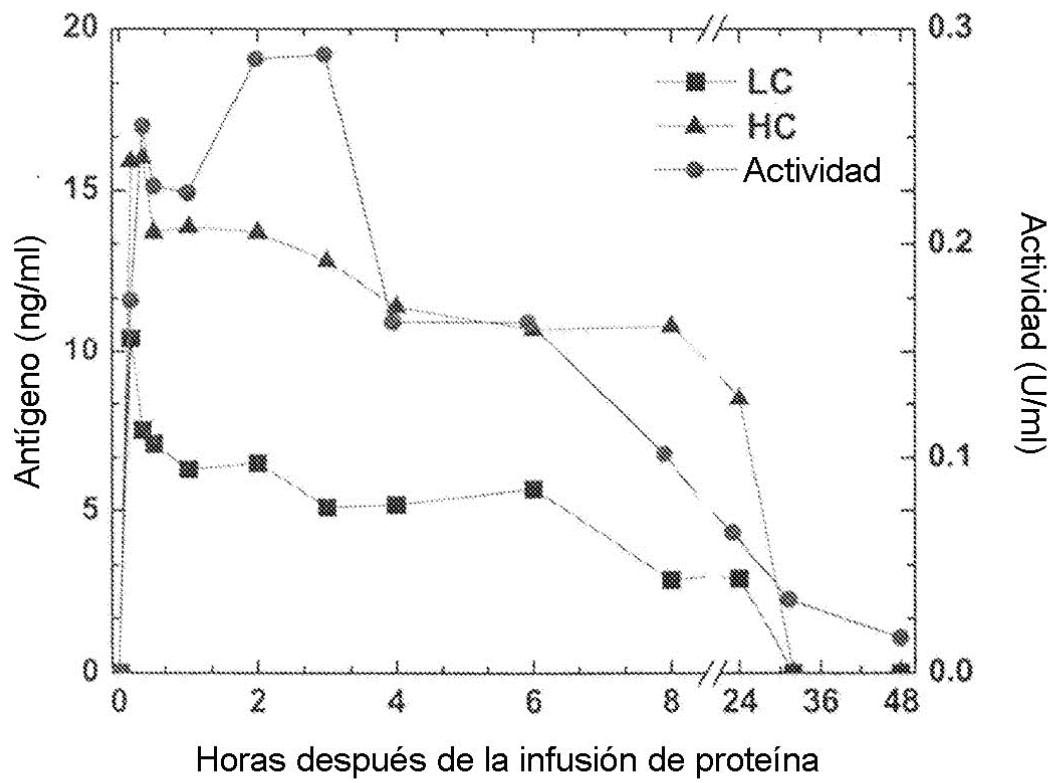


Figura 3B

<b>Perro con hemofilia A</b>	<b>Nº de perros</b>	<b>Exposición previa a plasma canino normal</b>	<b>Proteína canina</b>	<b>Dosis; Nº de infusiones</b>	<b>IgG anti cFVIII</b>	<b>Título de Bethesda</b>
<b>Adulto (6-9 años)</b>	2	+	BDD recombinante	2,5 µg/kg; 5 infusiones	No	No
<b>Neonatos</b>	3	-	BDD recombinante	2 µg/kg; 15 infusiones	No	No
	2	-	Derivado de plasma	50 cc de plasma; 8 infusiones	No	No

Figura 3C



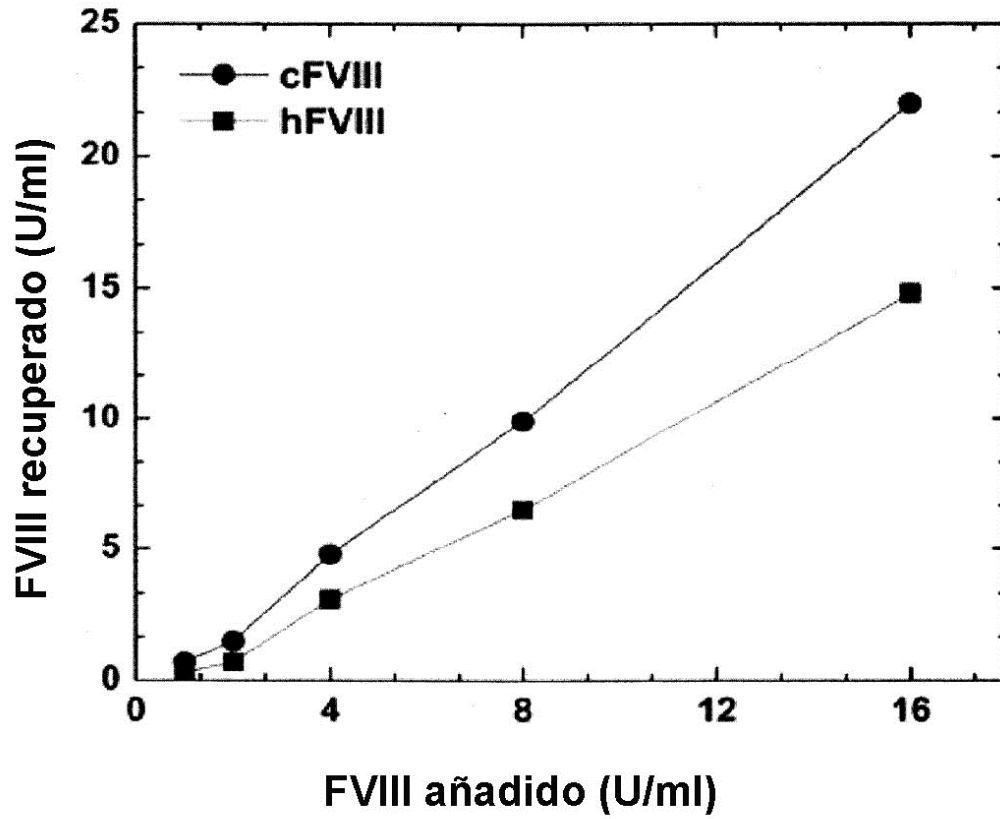
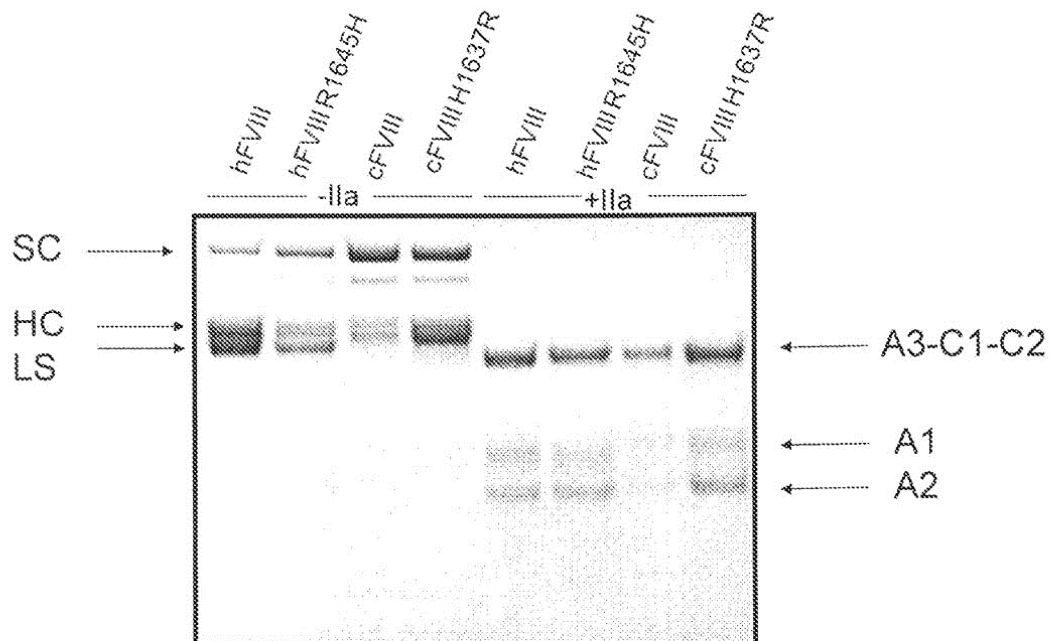


Figura 4



**Figura 5**

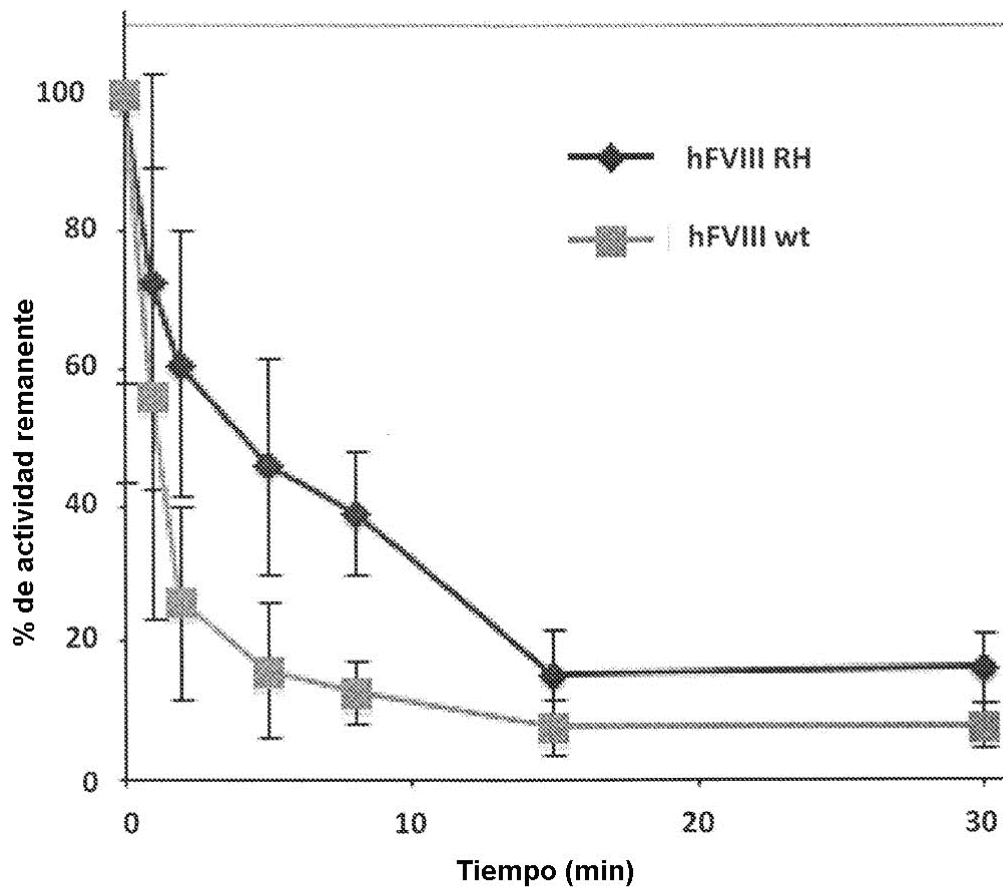


Figura 6

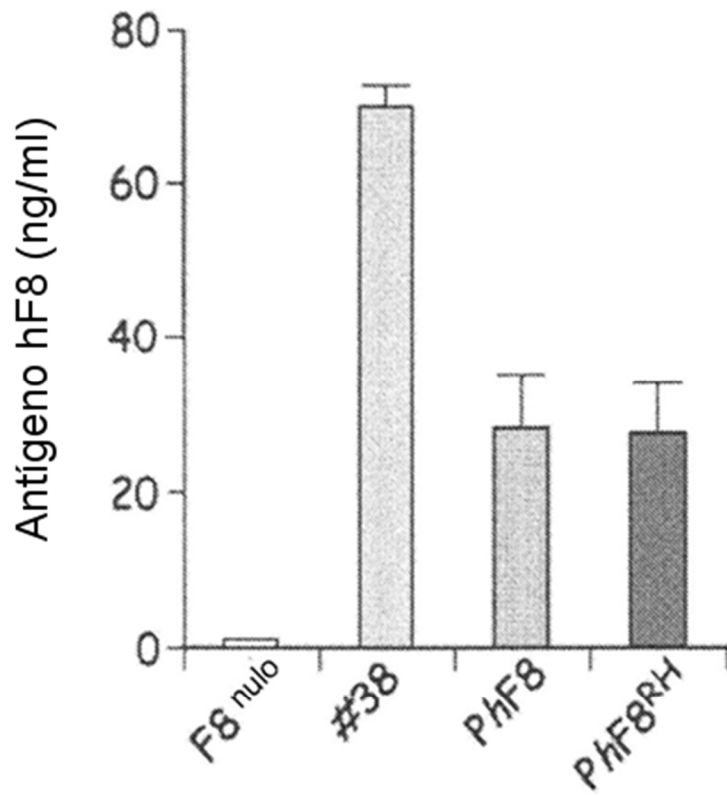


Figura 7A

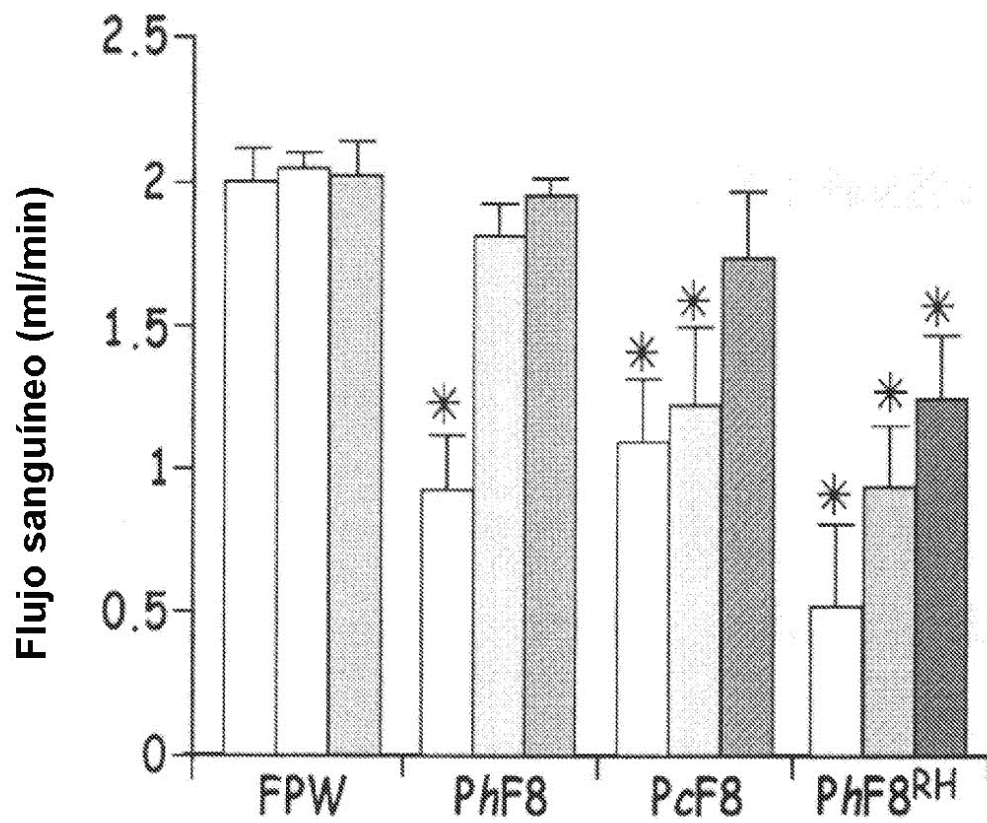


Figura 7B

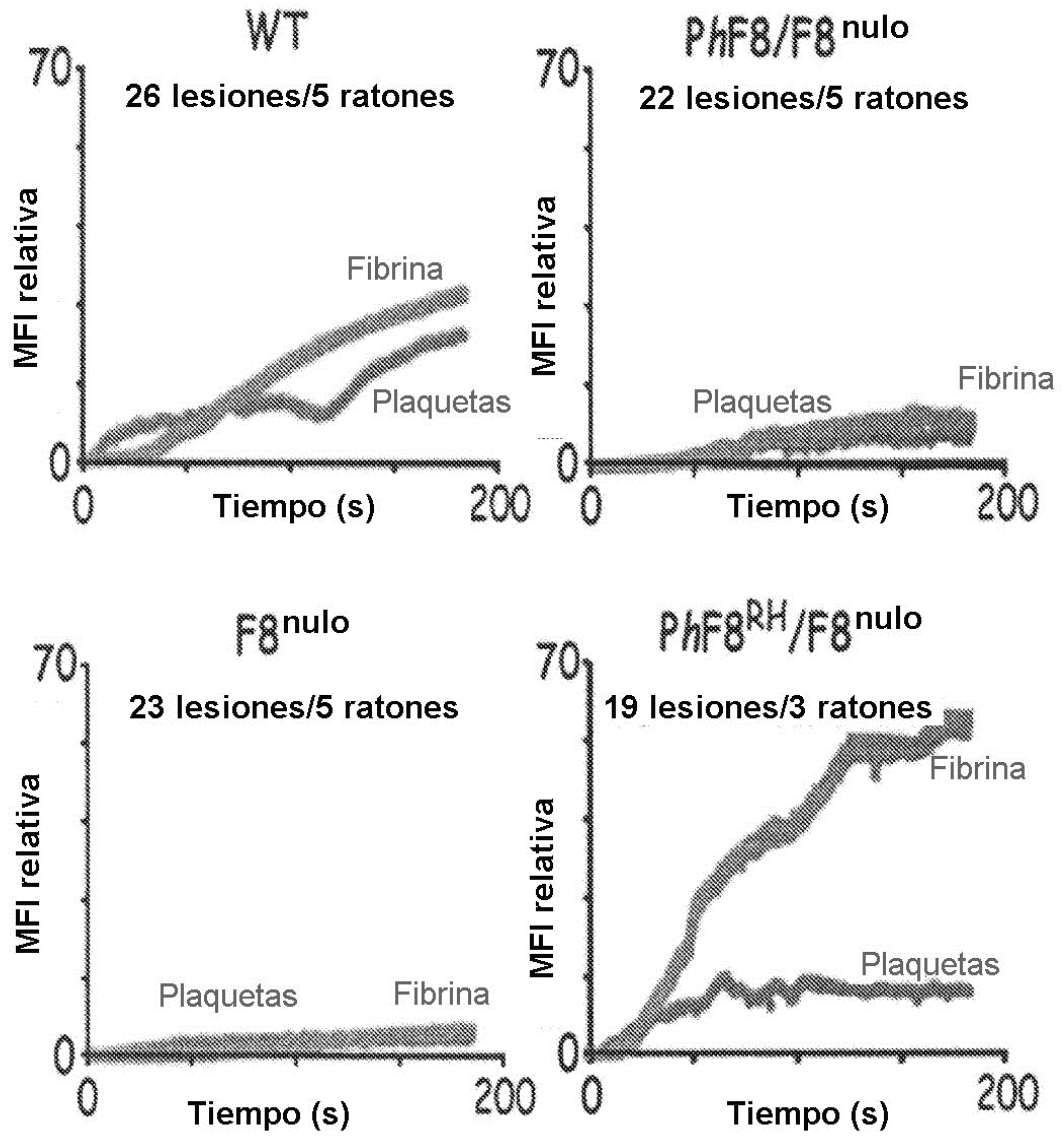


Figura 7C