

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 832**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005** **E 16186901 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020** **EP 3130601**

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:

27.04.2021

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
555 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591, 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:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 821 832 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) con el dominio B eliminado 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 muteínas del FVIII modificado 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. 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 (Saenko y col., 2002, Haemophilia 8, pp. 1-11). 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 A3C1C2 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 compite 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 aclara 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 peptídicos 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. 539-551). 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 (Harris y col., 2001, *Clinical Pharmacokinetics* 40(7): 539-551, Resumen).

Se ha intentado la modificación aleatoria de FVIII dirigiéndose a aminas 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 aminas 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.

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 del FVIII con el dominio B eliminado 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 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 actividad procoagulante del factor VIII que comprende un factor VIII polipeptídico funcional con el dominio B eliminado, que está mutado de manera que el resto de lisina en la posición de aminoácido 1804 se sustituye por un resto de cisteína de manera que exista un resto de cisteína mutante, en el que el factor VIII polipeptídico con el dominio B eliminado está unido covalentemente a un polímero biocompatible en el resto de cisteína mutante en la posición de aminoácido 1804. La invención también incluye un procedimiento para la preparación de este conjugado. La invención se dirige también a composiciones farmacéuticas que comprenden el conjugado y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. La invención también incluye el conjugado para su uso en el tratamiento de la hemofilia.

La invención también se refiere a un procedimiento para la PEGilación dirigida al sitio de una muteína del factor VIII que comprende (a) la expresión de una muteína del factor VIII polipeptídico con el dominio B eliminado dirigida al sitio en la que la muteína tiene una sustitución de cisteína en un resto de aminoácido en la posición de aminoácido 1804 y la cisteína está protegida; (b) la puesta en contacto de la muteína de cisteína con un reductor en condiciones para reducir moderadamente la muteína de cisteína y liberar la protección; (c) la eliminación de la protección y del reductor de la muteína de cisteína; y (d) al menos 5 minutos después de la eliminación del reductor, el tratamiento de la muteína de cisteína con PEG que comprende una fracción de acoplamiento de sulfhidrilo en condiciones tales que se produzca la muteína del factor VIII PEGilada.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Mapas de vector y estrategia de mutagénesis para las muteínas de PEG.

FIG. 2. 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. 3. 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 μ M 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.

FIG. 4. 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 FVIII polipeptídicos con el dominio B eliminado mutados 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
10 que tenían uniones aleatorias del polímero a FVIII o uniones en el extremo N. Dicha 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. Dicha unión dirigida al sitio también permite un producto uniforme más que los conjugados heterogéneos producidos en la técnica por acoplamiento aleatorio del polímero.

Definiciones

Polímero biocompatible. Un polímero biocompatible incluye óxidos de polialquileno tal como polietilenglicol (PEG).

Polietilenglicol (PEG). "PEG" y "polietilenglicol" como se utilizan en el presente documento son intercambiables e incluyen cualquier poli(óxido de etileno) hidrosoluble. El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, mayor del 50 %, de subunidades -OCH₂CH₂-repetidas.

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

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 (NPPVLKRHR, 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.

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 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
30 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.

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

Discusión

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
50 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 n.º K1600-1 Transformer de Clontech, el sistema de mutagénesis dirigida al sitio n.º 12397014 GenTaylor de Invitrogen, el kit de sistema de mutagénesis in vitro n.º Q6210 Altered Sites II de Promega, o el kit de mutagénesis por PCR n.º TAK RR016.

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.

5 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.

10 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).

15 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.

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

25 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la PEGilación dirigida al sitio de una muteína del factor VIII que comprende: (a) la expresión de una muteína del factor VIII polipeptídico con el dominio B eliminado dirigida al sitio en la que la muteína tiene una sustitución de cisteína en un resto de aminoácido en la posición de aminoácido 1804 y la cisteína tiene una protección; (b) la puesta en contacto de la muteína de cisteína con un reductor en condiciones para reducir moderadamente la muteína de cisteína y liberar la protección; (c) la eliminación de la protección y del reductor de la muteína de cisteína; y (d) al menos 5 minutos, y preferentemente al menos 15 minutos, aún más preferentemente al menos 30 minutos después de la eliminación del reductor, el tratamiento de la muteína de cisteína con PEG que comprende una fracción de acoplamiento de sulfhidrilo en condiciones tales que la muteína del factor VIII PEGilado se produzca. La fracción de acoplamiento de sulfhidrilo del PEG se selecciona del grupo que consiste en fracciones de tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo y maleimida, preferentemente maleimida.

30 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 principio 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 y sales. 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.

35 El procedimiento de la invención implica la sustitución de un aminoácido 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.

La posición 1804 se mutó a cisteína para permitir potencialmente el bloqueo de la unión a LRP tras la PEGilación.

40 En una realización, el medio de cultivo celular contiene cisteínas que "protegen" los restos de cisteína en la muteína mediante la formación de enlaces disulfuro. En la preparación del conjugado, la muteína de cisteína producida en el sistema recombinante se protege con una cisteína del medio y esta protección se retira mediante una reducción suave que libera la protección antes de añadir el reactivo polimérico específico de cisteína. Además, pueden usarse otros procedimientos conocidos en la técnica para la mutación específica del sitio de FVIII, como resultará evidente para un experto en la materia.

55 **Ejemplos**

Los ejemplos no cubiertos por las reclamaciones tienen fines ilustrativos.

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD DE FVIII. Que el Factor VIII BDD pudiera mutarse 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.

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-maleimidas, 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.

Stoilova-McPhie, S. y col., 2002, Blood 99(4), pp. 1215-23 muestra la estructura del BDD.

La especificidad de la PEGilación se puede conseguir modificando restos de cisteína únicos en el dominio 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.

La región 1811-1818 está implicada en la unión tanto con LRP como con FIX (Bovenschen y col., 2003, J. Biol. Chem. 278, pp. 9370-9377; Lenting y col., 1996, J. Biol. Chem. 271, pp. 1935-1940). PEG14 (1804) se diseñó para que estuviera 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.

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 ADNdc 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.

CEBADORES (SOLO EN SENTIDO DIRECTO) QUE SE UTILIZAN PARA MUTAGÉNESIS:

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

EXPRESIÓN DE MUTEÍNAS. Tras la inserción en un vector que da lugar a resistencia a Higromicina B, las muteínas de 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. n.º 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. n.º de cat. 821033, véase el Ensayo cromogénico). 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).

5 La PEG 14 de transfecciones transitorias y estables tenía el siguiente nivel de expresión: transitorias: 0,18 IU/ml; estables: 1,14 UI/ml.

10 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 inmutofinidad 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 inmutofinidad 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.

15 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. FVIII

20 En otro aspecto, 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 $1 \mu\text{M}$ se reduce medianamente con reductores tales como aproximadamente 0,7 mM de Tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) o 0,07 mM de ditiotreitól (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-

25 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.

30 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.

35 ANÁLISIS DE PEGILACIÓN POR ESCISIÓN POR TROMBINA Y TRANSFERENCIA DE WESTERN. El producto PEGilado se puede tratar con trombina ($40 \text{ UI}/\mu\text{g}$ 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 de la cadena pesada, mientras que la escisión por APC dividirá adicionalmente el dominio A2 en los fragmentos de 21 y 22 kD.

40 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD

45 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).

50 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).

55

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 rusticano (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

5 PURIFICACION DE FVIII PEGILADO POR CROMATOGRAFÍA 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 PEG14 tratada con control de tampón tiene una actividad de coagulación de 6,8 UI/ml frente a 3,2 UI/ml para la muestra de PEG14 PEGilada de 12 kD. Sin embargo, 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 la PEG14 tratada 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 %).

15 Para confirmar los efectos del PEG sobre la actividad de coagulación de PEG14, se purificaron las 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.

20 ESTUDIO DE PK EN RATÓN. 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 extraen 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 ensayan en cuanto a la concentración de FVIII utilizando el procedimiento del ensayo cromogénico que se ha descrito anteriormente. La PEG14 PEGilada presenta una recuperación de plasma mayor en comparación con BDD.

Tabla 6. Sumario del estudio de PK de FVIII PEGilado que muestra las semividas en horas.

Construcción	Semivida, h	Especies
BDD	4,5	Ratón normal
PEG14-33 kD PEG	7,3	Ratón normal
PEG14-12 kD PEG	5,5	Ratón normal

Tabla 7. Recuperación en plasma de muteína PEG14 PEGilada 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 14	33 kD	2,5

35 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, como conoce un experto en la materia. 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 µl 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 n.º 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.

40 Para explorar rápidamente un gran número de muteínas de 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 incubó 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 β a C β entre K1804 y K1808 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 la K1808 PEGilada de 33 kD, con la ventaja de tener un rendimiento de PEGilación mucho mayor. La PEGilación 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.

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 la doble muteína PEG2+14 (L491C y K1804C) con TCEP a concentraciones que variaban de 67 uM a 670 uM. 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.

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

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Los cuatro primeros aminoácidos del dominio B de la secuencia del Factor VIII humano

<400> 1

Ser Phe Ser Gln

1

<210> 2

<211> 10

ES 2 821 832 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Los diez últimos aminoácidos del dominio B de la secuencia del Factor VIII humano

5 <400> 2

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 1457

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivada de la secuencia del factor VIII humano

<400> 3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

15

ES 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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

5 <210> 4
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<220>
 <223> Secuencia del factor VIII humano

10 <400> 4

ES 2 821 832 T3

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

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

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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 2 821 832 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

<220>
 <223> Cebador PEG1 utilizado para mutagénesis

<400> 5
 gatgtccgtc cttgtgctc aaggagatta cca 33

10 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador PEG2 utilizado para mutagénesis

<400> 6
 ttgtattcaa ggagatgcc aaaagtgta aaac 34

20 <210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador PEG3 utilizado para mutagénesis

ES 2 821 832 T3

	<400> 7 ttaccaaag gtgtatgcca ttgaaggat tttc	34
5	<210> 8 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador PEG4 utilizado para mutagénesis	
10	<400> 8 aaggatttc caattgccc aggagaaata ttc	33
15	<210> 9 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador PEG 5 utilizado para mutagénesis	
20	<400> 9 gattatattt aagaattgcg caagcagacc atat	34
25	<210> 10 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador PEG6 utilizado para mutagénesis	
30	<400> 10 tagaaaaaac ttgtctgcc ctaatgaaac caaaac	36
35	<210> 11 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador PEG7 utilizado para mutagénesis	
40	<400> 11 aactttgtca agccttgca aaccaaact tac	33
45	<210> 12 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador PEG8 utilizado para mutagénesis	
50	<400> 12 gtcaagccta atgaatgcaa aactacttt tgga	34
	<210> 13 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador PEG9 utilizado para mutagénesis	
	<400> 13 caagcctaat gaaacctgca cttactttg gaaag	35

ES 2 821 832 T3

	<210> 14	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador PEG10 utilizado para mutagénesis	
	<400> 14	
	ctaatgaaac caaaactgct tttggaaag tgcaac	36
10	<210> 15	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG11 utilizado para mutagénesis	
15	<400> 15	
	atttctatg aggaatgcca gaggcaagga gca	33
20	<210> 16	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG12 utilizado para mutagénesis	
	<400> 16	
	tcttatgagg aagattgcag gcaaggagca gaa	33
25	<210> 17	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador PEG13 utilizado para mutagénesis	
	<400> 17	
	caaggagcag aacctgcaa aaactttgtc aagcct	36
35	<210> 18	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG14 utilizado para mutagénesis	
40	<400> 18	
	ggagcagaac ctatagca cttgtcaag cct	33
45	<210> 19	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG15 utilizado para mutagénesis	
	<400> 19	
	cgctcagttg ccaagtgca tcctaaact tgg	33
50	<210> 20	
	<211> 33	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG16 utilizado para mutagénesis	
5	<400> 20 tcagttgccca agaagtgcc taaaactgg gta	33
	<210> 21	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador PEG17 utilizado para mutagénesis	
	<400> 21 ctctcatct gctactgca atctgtagat caa	33
	<210> 22	
15	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG18 utilizado para mutagénesis	
20	<400> 22 caaaatcttt tccattctgc acctcagtcg tgtac	35
	<210> 23	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG19 utilizado para mutagénesis	
	<400> 23 gtcaatggtt atgtatgcag gtctctgccca ggt	33
30	<210> 24	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador PEG20 utilizado para mutagénesis	
	<400> 24 cagacttatc gaggatgttc cactggaacc tta	33
	<210> 25	
40	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG21 utilizado para mutagénesis	
45	<400> 25 atccaggctg aggtttgga tacagtggtc att	33
	<210> 26	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Cebador PEG22 utilizado para mutagénesis	
	<400> 26	
	gaagatgata aagtctgtcc tggggaagc cat	33
5	<210> 27	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG23 utilizado para mutagénesis	
10	<400> 27	
	cagcggattg gtaggtgta caaaaaagtc cga	33
	<210> 28	
	<211> 33	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG24 utilizado para mutagénesis	
	<400> 28	
	gaagatgggc caactgctc agatcctcgg tgc	33
20	<210> 29	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador PEG25 utilizado para mutagénesis	
	<400> 29	
	cagataatgt cagactgcag gaatgtcatc ctg	33
	<210> 30	
30	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG26 utilizado para mutagénesis	
	<400> 30	
35	cacactaaca cactgtgtcc tgctcatggg aga	33
	<210> 31	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador PEG27 utilizado para mutagénesis	
	<400> 31	
	cagatggaag atccctgctt taaagagaat tat	33
	<210> 32	
45	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG28 utilizado para mutagénesis	
50	<400> 32	

ES 2 821 832 T3

	accaggggtg cccgttgcaa gttctccagc ctc	33
	<210> 33	
	<211> 33	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG29 utilizado para mutagénesis	
	<400> 33	
	aaagtaaagg tttttgcfgg aaatcaagac tcc	33
10	<210> 34	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador PEG30 utilizado para mutagénesis	
	<400> 34	
	ttgcagttgt cagttgcttt gcatgaggtg gca	33
	<210> 35	
20	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PEG31 utilizado para mutagénesis	
	<400> 35	
25	aatatgaaa gaaacgctag ggctccctgc aat	33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado que tiene actividad procoagulante del factor VIII que comprende un factor VIII polipeptídico funcional con el dominio B eliminado que está mutado de manera que el resto de lisina en la posición de aminoácido 1804 se sustituye por un resto de cisteína de manera que exista un resto de cisteína mutante, en el que el factor VIII polipeptídico con el dominio B eliminado está unido covalentemente a un polímero biocompatible en el resto de cisteína mutante en la posición de aminoácido 1804.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero biocompatible comprende polietilenglicol.
3. El conjugado de la reivindicación 2, en el que el polietilenglicol comprende metoxipolietilenglicol.
- 10 4. Una composición farmacéutica para administración parenteral que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de la reivindicación 1 y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
5. Un conjugado de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la hemofilia.
6. Un procedimiento para la preparación del conjugado de la reivindicación 2, que comprende:
 - 15 (a) la expresión de una muteína del factor VIII polipeptídico con el dominio B eliminado dirigida al sitio en la que la muteína tiene una sustitución de cisteína en un resto de aminoácido en la posición de aminoácido 1804 y la cisteína está protegida;
 - (b) la puesta en contacto de la muteína de cisteína con un reductor en condiciones para reducir moderadamente la muteína de cisteína y liberar la protección;
 - (c) la eliminación de la protección y el reductor de la muteína de cisteína; y
 - 20 (d) al menos 5 minutos después de la eliminación del reductor, el tratamiento de la muteína de cisteína con PEG que comprende una fracción de acoplamiento de sulfhidrilo en condiciones tales que se produzca la muteína del factor VIII PEGilada.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que en la etapa (c) la protección y el reductor se eliminan de la muteína de cisteína mediante cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el PEG tiene un intervalo de tamaño de 5 kD a 64 kD.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la fracción de acoplamiento de sulfhidrilo del PEG se selecciona del grupo que consiste en fracciones de tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo y maleimida.

Mutagénesis y Sub-clonación de BDD-PegN

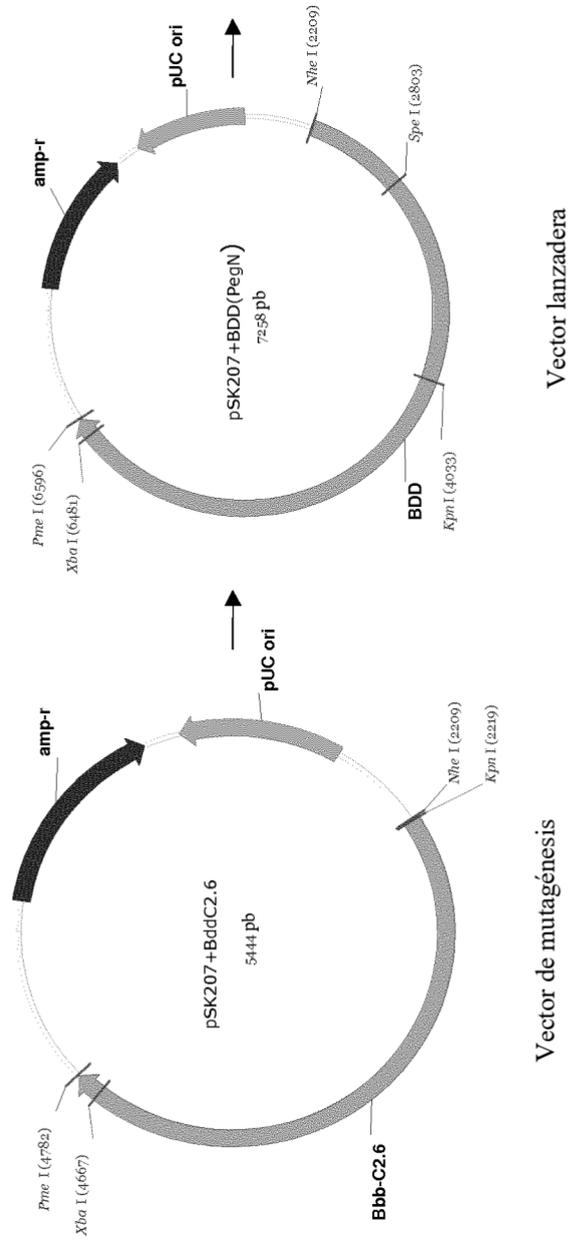
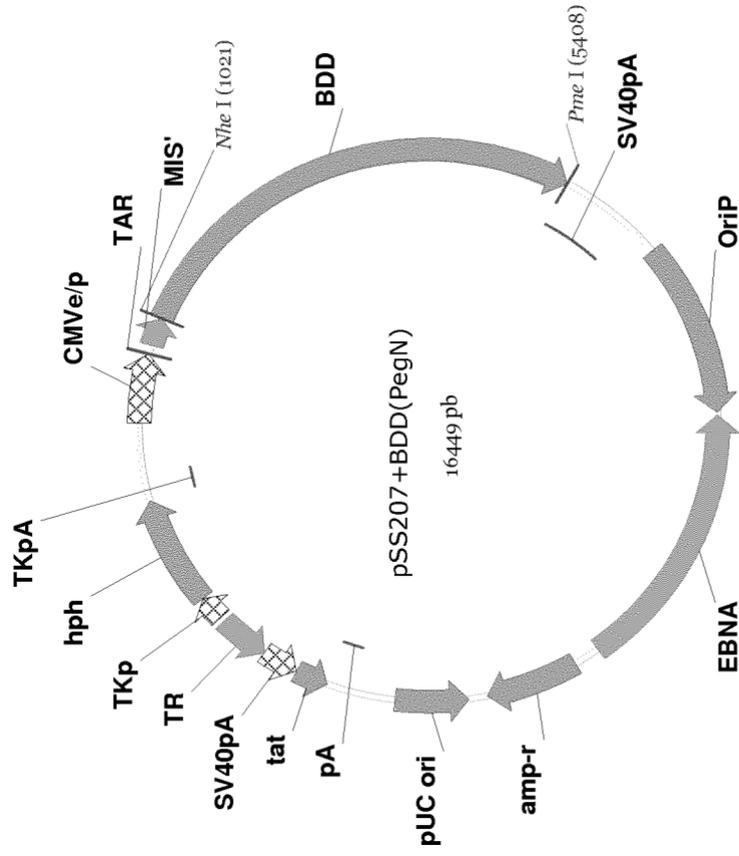


FIG. 1a

Mutagénesis y Sub-clonación de BDD-PegN



Vector de mutagénesis

FIG. 1b

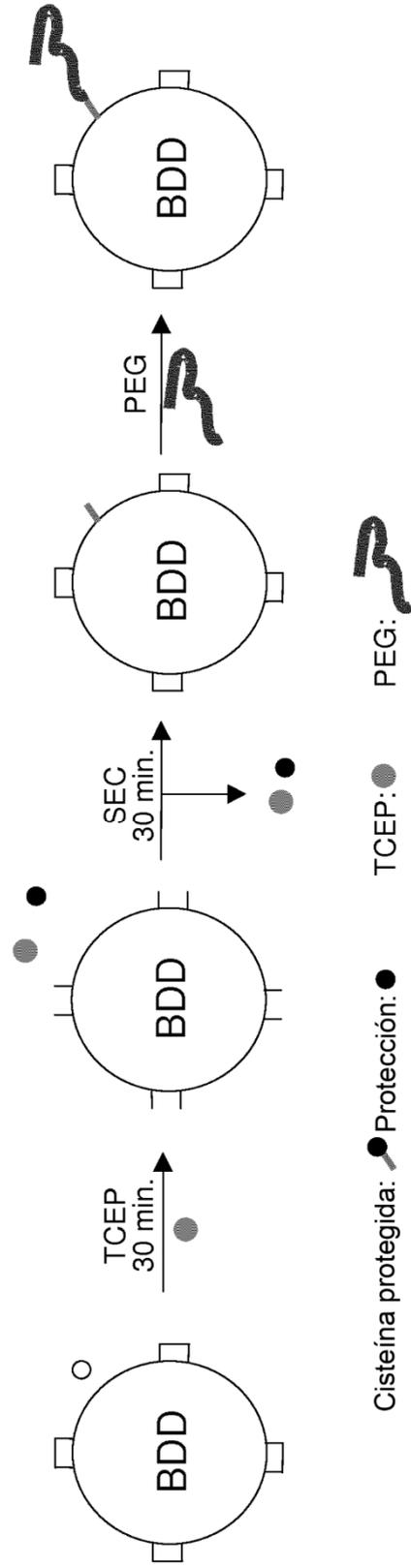


FIG. 2

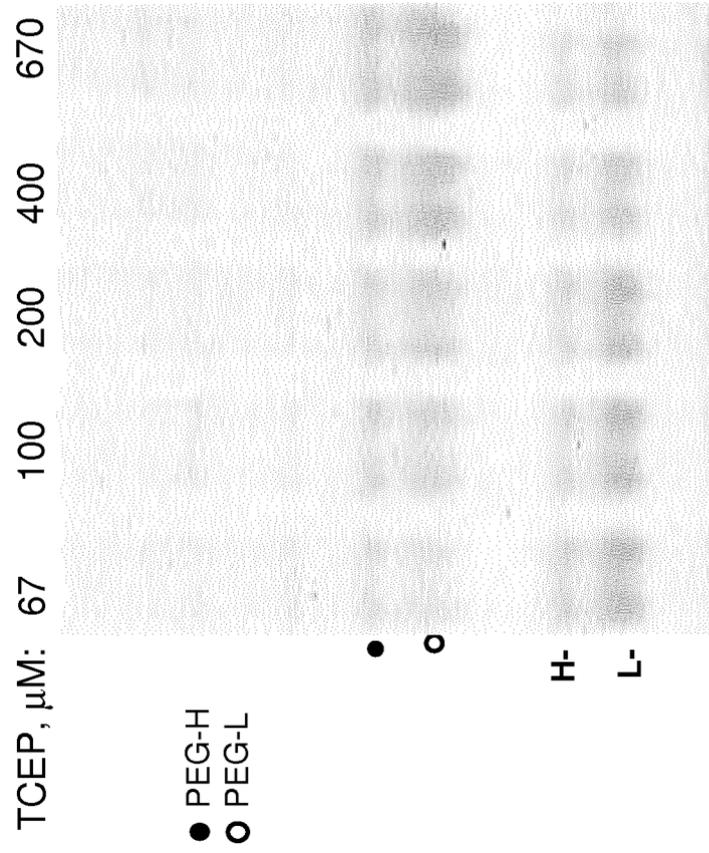


FIG. 3

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

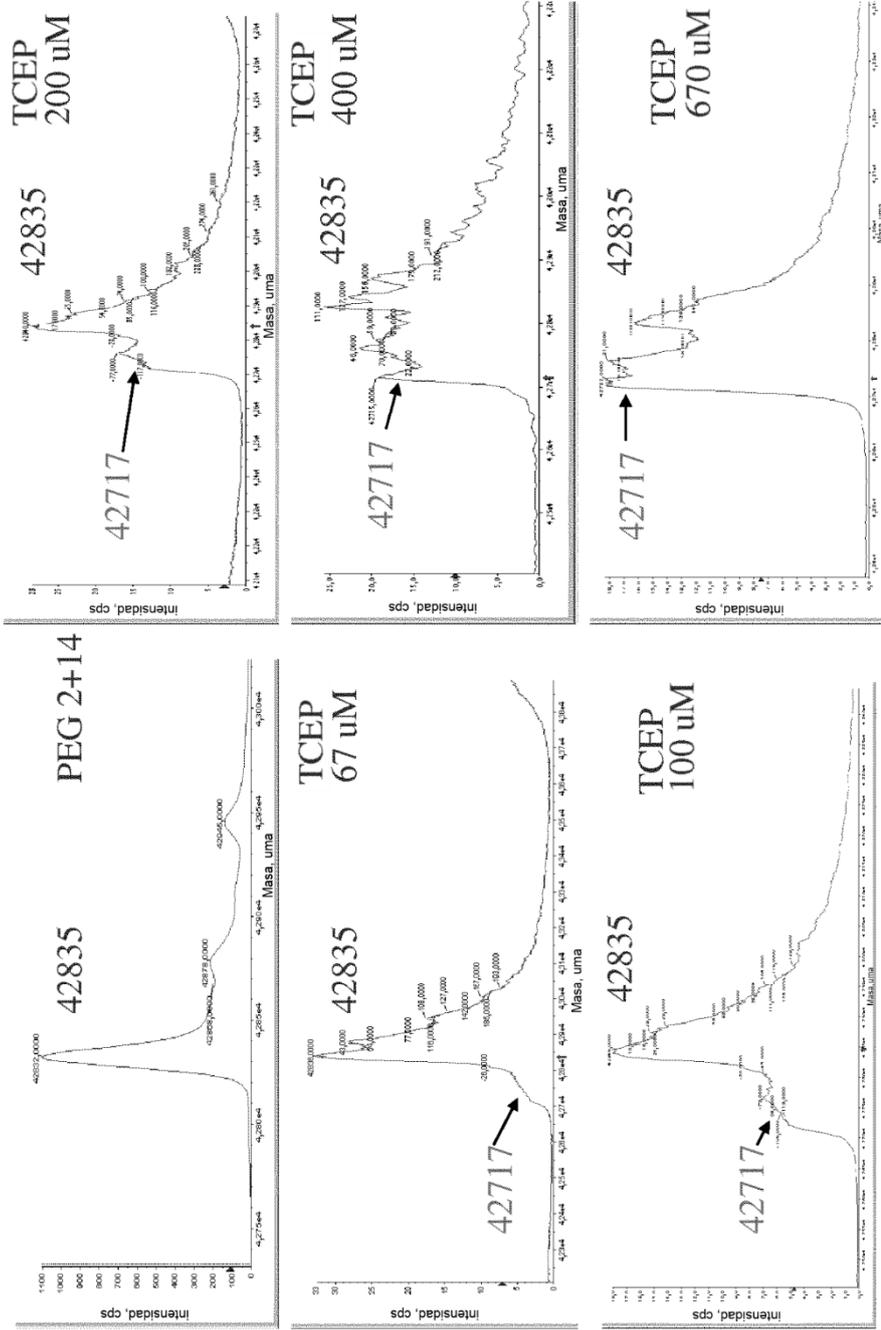


FIG. 4