



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013011041-4 B1



(22) Data do Depósito: 04/11/2011

(45) Data de Concessão: 25/05/2021

(54) Título: VARIANTE DE FATOR VIII, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA VARIANTE DE FVIII, USO DA VARIANTE DE FATOR VIII, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 38/37; A61K 35/14.

(30) Prioridade Unionista: 05/11/2010 US 61/410437.

(73) Titular(es): BAXALTA GMBH; BAXALTA INCORPORATED.

(72) Inventor(es): CHEE KONG LAI; RODDY KEVIN STAFFORD.

(86) Pedido PCT: PCT US2011059297 de 04/11/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/061689 de 10/05/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/05/2013

(57) Resumo: VARIANTE DE FATOR VIII, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA DE MAMÍFERO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA VARIANTE DE FVIII, USO DA VARIANTE DE FATOR VIII, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção está no campo da terapia de hemofilia. Ela se refere a uma nova variante de fator anti-hemofílico VIII tendo elevada atividade específica em comparação com produtos de fator VIII conhecidos.

“VARIANTE DE FATOR VIII, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA VARIANTE DE FVIII, USO DA VARIANTE DE FATOR VIII, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção está no campo de fatores de coagulação do sangue e hemofilia. Ela se refere a uma nova variante do fator anti-hemofílico VIII (FVIII), designada aqui rFVIIIv3, tendo uma atividade específica aumentada em comparação aos produtos do fator VIII conhecidos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A coagulação do sangue começa quando as plaquetas aderem à parede cortada de um vaso sanguíneo ferido em um local de lesão. Subsequentemente, em uma cascata de reações enzimaticamente reguladas, as moléculas de fibrinogênio solúveis são convertidas pela enzima trombina em cadeias insolúveis de fibrina que mantêm as plaquetas juntas em um trombo. Em cada etapa na cascata, um precursor da variante é convertido em uma protease que cliva o próximo precursor da variante na série. Cofatores são requeridos na maioria das etapas.

[003] O fator VIII (também chamado de fator anti-hemofílico VIII ou FVIII) circula como um precursor inativo no sangue, ligado firmemente e não covalentemente ao fator de von Willebrand. O fator VIII é ativado proteoliticamente pela trombina ou pelo fator Xa, que o dissocia do fator de von Willebrand e ativa sua função pró-coagulante na cascata. Em sua forma ativa, o fator VIIIa variante é um cofator que aumenta a eficiência catalítica do fator IXa para a ativação do fator X por diversas ordens de magnitude.

[004] A clonagem do FVIII humano revelou que a variante contém 2332 aminoácidos organizados dentro de um número de domínios com a sequência A1-A2-B-A3-C1-C2 (Vehar et al., 1984, Nature 312, 337-342; Toole et al., 1984, Nature 312, 342-347 e Wood et al., 1984, Nature 312, 330-337). A maioria do FVIII é heterodimérica no plasma, contendo um derivado

de cadeia leve e vários derivados de cadeia pesada. A estrutura heterodimérica é devido à clivagem proteolítica do precursor na arginina¹⁶⁴⁸, resultando em cadeias pesadas e leves que compreendem A₁-A₂-B e A₃-C₁-C₂, respectivamente. A heterogeneidade dentro da cadeia pesada é explicada pela proteólise limitada dentro de seu domínio B carbóxi-terminal.

[005] A fim de funcionar como um cofator para a ativação do fator X, FVIII requer proteólise limitada pelo fator Xa ou pela trombina. Esta ativação envolve a clivagem na arginina nas posições 372 e 740 na cadeia pesada e na posição 1689 na cadeia leve. Estabeleceu-se que em comparação com o precursor inativo, o cofator de FVIII ativo não tem um fragmento de cadeia leve 1649-1689 e o domínio B inteiro (Mertens et al., 1993).

[006] As pessoas com deficiências no fator VIII ou anticorpos contra o fator VIII que não são tratadas com o fator VIII sofrem o sangramento interno descontrolado que pode causar uma gama de sintomas sérios, de reações inflamatórias nas juntas à morte precoce. Hemofílicos graves, que contam aproximadamente 10.000 nos Estados Unidos, podem ser tratados com a infusão do fator humano VIII, que restaurará a capacidade de coagulação normal do sangue se administrado com frequência e concentração suficientes. A definição clássica do fator VIII, de fato, é a substância presente no plasma sanguíneo normal que corrige o defeito de coagulação no plasma derivado dos indivíduos com hemofilia A.

[007] Diversas preparações do fator VIII derivado do plasma humano de graus variados de pureza estão disponíveis comercialmente para o tratamento da hemofilia A. Estas incluem um fator VIII parcialmente purificado derivado do acúmulo de sangue de muitos doadores que é tratado com calor e detergente para vírus, mas contém um nível significativo de variantes antigênicos; um fator VIII purificado por anticorpo monoclonal que tem níveis mais baixos de impurezas antigênicas e a contaminação viral; e fator humano recombinante VIII.

[008] O desenvolvimento dos anticorpos (“inibidores” ou “anticorpos inibidores”) que inibem a atividade do fator VIII é uma complicação séria no gerenciamento dos pacientes com hemofilia.

[009] Os aloanticorpos se desenvolveram em aproximadamente 20% dos pacientes com hemofilia A em resposta às infusões terapêuticas do fator VIII. Nos pacientes previamente não tratados com hemofilia A que desenvolvem inibidores, o inibidor se desenvolve geralmente dentro de um ano do tratamento. Adicionalmente, os anticorpos (autoanticorpos) que inativam o fator VIII se desenvolvem ocasionalmente nos indivíduos com níveis do fator VIII previamente normais. Se o título do inibidor for baixo o bastante, os pacientes podem ser controlados pelo aumento da dose do fator VIII. No entanto, muitas vezes o título do inibidor é tão elevado que não pode ser esgotado pelo fator VIII. Uma estratégia alternativa é contornar a necessidade do fator VIII durante a homeostase normal usando preparações de concentrado complexo de protrombina ativadas (por exemplo, KONYNE (Cutter Laboratories), FEIBA (Baxter Healthcare), PROPLEX (Baxter Healthcare)) ou fator VIIa humano recombinante. Adicionalmente, já que o fator VIII porcino tem geralmente substancialmente menos reatividade com os inibidores do que o fator VIII humano, uma preparação de fator VIII porcino parcialmente purificada (HYATE: C (IPSEN Pharma)) foi usada. Muitos pacientes que desenvolveram anticorpos inibidores para o fator VIII humano foram tratados com sucesso com o fator VIII porcino e toleraram tal tratamento por períodos de tempo longos.

[0010] Entretanto, os interesses da saúde pública a respeito do risco dos vírus ou de outros contaminadores carregados pelo sangue limitaram a utilidade do fator VIII porcino purificado do sangue de porcos. Uma variante do fator VIII porcino recombinante conseqüentemente foi desenvolvido, que fosse designado “OBI-1” e descrito, por exemplo, em WO 01/68109. OBI-1 é um FVIII porcino parcialmente deletado de domínio B.

Esta molécula está presentemente em desenvolvimento clínico.

[0011] As variantes do fator VIII deletadas de domínio B são conhecidas por manter a atividade pró-coagulante e de cofator do fator VIII. Além disso, Mertens et al. (British Journal of Haematology 1993, 85, 133-142) descreve as variantes do fator VIII humano recombinante sem o domínio B e a sequência de cadeia pesada que mede da Lisina 713 à Arginina 740.

[0012] Muitos hemofílicos requerem a reposição diária do fator VIII para impedir o sangramento e a artropatia hemofílica deformante resultante. Em vista disso, há uma necessidade por uma molécula de fator VIII mais potente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0013] Em um primeiro aspecto, a invenção se refere a variante de fator VIII (FVIII) deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, a variante de FVIII sendo desprovida de uma sequência de até 27 aminoácidos correspondente aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII porcino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7. Esta sequência de 27 aminoácidos, NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO: 10), pode ser parcialmente ou completamente deletada.

[0014] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma variante de FVIII deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, a variante de FVIII sendo desprovida de uma sequência de até 27 aminoácidos correspondente aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII porcino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7, onde 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 aminoácidos podem ser deletados. Em outra modalidade, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 ou 20 aminoácidos são deletados. Em outra modalidade, 27, 26, ou 25 aminoácidos são deletados. Em outra modalidade, os 27 aminoácidos correspondentes a

DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO:10) são deletados.

[0015] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma variante de FVIII deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, a variante de FVIII sendo desprovida de uma sequência de até 27 aminoácidos correspondente aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII humano como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8, onde 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 aminoácidos podem ser deletados. Em outra modalidade, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 ou 20 aminoácidos são deletados. Em outra modalidade, 27, 26, ou 25 aminoácidos são deletados. Em outra modalidade, os 27 aminoácidos correspondentes a NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO:11) são deletados.

[0016] Em outra modalidade, a invenção se refere a uma variante de FVIII porcino deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada sendo completamente desprovida dos 27 aminoácidos correspondentes a DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO:10).

[0017] Em outra modalidade, a invenção se refere a uma variante de FVIII humano deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada sendo completamente desprovida dos 27 aminoácidos correspondentes a NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO:11).

[0018] Em outra modalidade, a invenção se refere a uma variante de FVIII canino deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada sendo completamente desprovida dos 27 aminoácidos correspondentes a NIDDYYEDTYEDIPTLLNENNVIKPR (SEQ ID NO:12).

[0019] Um segundo aspecto da invenção se refere a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo como definido no primeiro aspecto e modalidades descritas.

[0020] Em um terceiro aspecto, a invenção refere-se a um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo como definido no segundo aspecto.

[0021] Um quarto aspecto da invenção se refere a uma célula de mamífero que compreende um vetor de expressão como definido no terceiro aspecto.

[0022] Em um quinto aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir um FVIII como definido no primeiro aspecto, compreendendo as etapas de:

a. Cultivar uma célula de mamífero de acordo com o quarto aspecto; e

b. Isolar da célula de mamífero a variante de FVIII.

[0023] Um sexto aspecto da invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma variante de FVIII como definido no primeiro aspecto.

[0024] Em um sétimo aspecto, a invenção refere-se a método para tratar um paciente que sofre de hemofilia compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de FVIII de acordo com o primeiro aspecto da invenção a um paciente em necessidade do mesmo, desse modo tratando a hemofilia no dito paciente.

[0025] Em um oitavo aspecto, a invenção refere-se a uma variante de FVIII de acordo com o primeiro aspecto para uso no tratamento da hemofilia.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0026] Fig. 1 mostra a quantidade de proteína em μg por dose necessária para 5 produtos de FVIII conhecidos (colunas em branco) e o novo rpFVIIIv3 (coluna tracejada). BDD=deletado de domínio B; FL=comprimento completo; u= μ ;

[0027] Fig. 2 a-e são continuações da mesma sequência. Fig 2a-e mostra um alinhamento de sequência entre as sequências do fator VIII de humano (*homo sapiens*), porco (*sus scrofa*), camundongo (*mus musculus*) e cachorro (*canis familiaris*). Este alinhamento de sequência é retirado de HADB (também conhecido como HAMSTeRS) 2010, homepage da

Haemophilia A Mutation Database e um site de recurso para trabalho no fator VIII (hadb.org.uk). A numeração segue a sequência humana e não é idêntica aos números de aminoácidos das sequências na Listagem de Sequência. A sequência em **negrito** mais **sublinhado duplo** ilustra a sequência que está faltando nas variantes FVIIIv3 recombinantes da invenção. A sequência sublinhada é a sequência do domínio B. A sequência marcada em cinza é a porção do domínio B que pode ser retida nas sequências de FIIIv3 parcialmente deletadas em domínio B da invenção; e

[0028] Fig. 3 mostra um exemplo típico do perfil SEC dos padrões de calibração e a regressão linear da curva de calibração como descrito no Exemplo 5.

[0029] BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

[0030] SEQ ID NO: 1 mostra a sequência do FVIIIv3 porcino parcialmente deletado de domínio B;

[0031] SEQ ID NO: 2 mostra a sequência de um FVIIIv3 humano deletado de domínio B;

[0032] SEQ ID NO: 3 mostra a sequência de FVIIIv3 canino deletado de domínio B;

[0033] SEQ ID NO: 4 mostra a sequência do domínio B de FVIII porcino que pode estar presente em uma molécula de FVIII parcialmente deletada de domínio B da invenção (o assim chamado “ligante de domínio B”);

[0034] SEQ ID NO: 5 mostra uma sequência de ligante de domínio B do domínio B de FVIII humano que pode estar presente em uma molécula de FVIII parcialmente deletada de domínio B da invenção;

[0035] SEQ ID NO: 6 mostra uma sequência de ligante de domínio B do domínio B de FVIII canino que pode estar presente em uma molécula de FVIII parcialmente deletada de domínio B da invenção;

[0036] SEQ ID NO: 7 mostra a sequência de aminoácido do FVIII porcino de comprimento completo;

[0037] SEQ ID NO: 8 mostra a sequência de aminoácido do FVIII humano de comprimento completo;

[0038] SEQ ID NO: 9 mostra a sequência de aminoácido do FVIII canino de comprimento completo;

[0039] SEQ ID NO: 10 mostra a sequência de 27 peptídeos que corresponde aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII porcino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7;

[0040] SEQ ID NO:11 mostra a sequência de 27 peptídeos que corresponde aos aminoácidos 714 a 740 do fator VIII humano como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8; e

[0041] SEQ ID NO: 12 mostra a sequência de 27 peptídeos que corresponde aos aminoácidos 714 a 740 do fator VIII canino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 708 a 734 de SEQ ID NO: 9.

[0042] DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0043] A invenção é baseada na descoberta de uma variante de uma proteína de fator VIII porcino recombinante parcialmente deletado de domínio B que contém uma deleção do aminoácido 27 particular. Esta variante, que é aqui designada rpFVIIIv3, foi mostrada por ter uma atividade específica aumentada em comparação a uma proteína semelhante contendo o alongamento do aminoácido 27, especialmente um FVIII porcino recombinante parcialmente deletado de domínio B chamado "OBI-1". OBI-1, sua sequência de aminoácido e polinucleotídeos que codificam OBI-1 são conhecidos, por exemplo, a partir da US 6.458.563.

[0044] A invenção se refere uma variante de fator VIII (FVIII) deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, em que a variante de FVIII é desprovida de uma sequência de aminoácido correspondente aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII porcino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7.

[0045] Adicionalmente, a invenção se refere a uma variante de FVIII

deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, a variante de FVIII sendo desprovida de uma sequência de 27 aminoácidos correspondente aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII porcino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7, onde 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 aminoácidos podem ser deletados. Em uma variante, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 ou 20 aminoácidos são deletados. Em outra variante, 27, 26, ou 25 aminoácidos são deletados. Na variante rpFVIIIv3, os 27 aminoácidos correspondentes a DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO:10) são deletados.

[0046] Adicionalmente, a invenção se refere a uma variante de FVIII deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, a variante de FVIII sendo desprovida de uma sequência de 27 aminoácidos correspondente aos aminoácidos 714 a 740 do fator VIII humano como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8, onde 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 aminoácidos podem ser deletados. Em uma variante, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 ou 20 aminoácidos são deletados. Em outra variante, 27, 26, ou 25 aminoácidos são deletados. Em uma variante de FVIIIv3 humano (rhFVIIIv3), os 27 aminoácidos correspondentes a NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO:11) são deletados.

[0047] Adicionalmente, a invenção se refere a uma variante de FVIII deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante isolada, a variante de FVIII sendo desprovida de uma sequência de 27 aminoácidos correspondente aos aminoácidos 714 a 740 do fator VIII canino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 708 a 734 de SEQ ID NO: 9, onde 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 aminoácidos podem ser deletados. Em uma variante, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 ou 20 aminoácidos são deletados. Em outra variante, 27, 26, ou 25

aminoácidos são deletados. Em uma variante de FVIIIv3 canina (rcFVIIIv3), os 27 aminoácidos correspondentes a NIDDYYEDTYEDIPTPLLNNVVIKPR (SEQ ID NO:12) são deletados.

[0048] Tais variantes tiveram uma atividade específica elevada em comparação às variantes similares contendo a sequência de 27 aminoácidos intacta. De preferência, a atividade específica é aumentada por mais de 25% ou 30% ou 35% ou 40% ou 45% ou 50% ou 55% ou 60%.

[0049] O termo “atividade específica”, como usado aqui, refere-se à atividade que irá corrigir o defeito de coagulação do plasma deficiente do fator VIII humano. A atividade específica é medida em unidades de atividade de coagulação por miligrama da variante de fator VIII total em um ensaio padrão no qual o tempo de coagulação do plasma deficiente do fator VIII humano é comparado àquele do plasma humano normal. Um ensaio padrão adequado para medir a potência dos produtos de FVIII, que é aceito pela FDA para concentrados de FVIII de alta pureza, é chamado o ensaio de coagulação de um estágio (OSCA; ver o Exemplo 5; Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM., Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemofilia and a simple one-stage antihemophilic assay procedure, J Lab Clin Med, 1953; 41:637-47; Brand JT, Measurement of factor VIII: a potential risk factor for vascular disease, Arch Pathol Lab Med, 1993; 117:48-51; Preston FE, Kitchen S, Quality control and factor VIII assays, Haemophilia, 1998; 4:651-3; National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS USA). Determination of factor coagulant activities; Approved guideline, NCCLS Document H-48-A 1997; 17:1-36.). A quantidade da proteína de FVIII presente em uma amostra pode ser medida, por exemplo, por SEC HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho).

[0050] Uma unidade da atividade do fator VIII é a atividade presente em um mililitro do plasma humano normal. No ensaio, quanto menor o tempo para a formação do coágulo, maior a atividade do fator VIII sendo ensaiado. O fator VIII

porcino tem atividade de coagulação em um ensaio do fator VIII humano.

[0051] Em linha com a presente invenção, os termos “proteína” e “polipeptídeo” estão sendo usados como sinônimos.

[0052] Sendo “desprovida de uma sequência de aminoácido correspondente aos aminoácidos 716 a 742 como ilustrado na Fig. 2” significa que os aminoácidos 716 e 742, assim como os aminoácidos entre estas posições, são deletados, isto é, não incluídos, em uma variante de FVIII da invenção. Este alongamento dos aminoácidos consiste então em 27 aminoácidos, dos quais as variantes FVIII da invenção estão desprovidas.

[0053] As variantes do fator VIII da invenção são aqui globalmente designadas “variante(s) FVIII” ou “FVIIIv3” ou “rFVIIIvS”. Elas podem ser de porcino, humano, canino, murino ou de qualquer outra origem que é apropriada para a terapia humana ou animal. A Fig. 2 ilustra um alinhamento de sequência das sequências de FVIII de origem humana, porcina, murina e canina.

[0054] A sequência deletada nas variantes de FVIII da invenção é realçada em negrito e sublinhado duplo. Este alongamento dos aminoácidos pode ser identificado para as variantes de FVIII de outras espécies pela pessoa versada na técnica pelo alinhamento das sequências de FVIII de espécies adicionais com, por exemplo, a sequência porcina ou humana e tomando os aminoácidos que correspondem aos aminoácidos 716 a 742 de acordo com a Fig. 2 do presente pedido de patente.

[0055] As modalidades da invenção referem-se às variantes de FVIII de origem porcina, humana ou canina.

[0056] Em uma modalidade, a variante de FVIII de acordo com a invenção compreende a sequência de SEQ ID NO:1, ou uma variante da mesma compreendendo uma sequência sendo pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 1. É compreendido que a variabilidade de 10% leva em consideração as sequências fora do alongamento deletado dos aminoácidos, isto é, que a variante é completamente desprovida de DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ

ID NO:10), uma sequência de aminoácido correspondente aos aminoácidos 716 a 742 do fator VIII porcino como ilustrando na Figura 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7.

[0057] Em uma modalidade adicional, a variante de FVIII da invenção compreende a sequência de SEQ ID NO:2, ou uma variante da mesma compreendendo uma sequência sendo pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 2. Novamente, a variante é compreendida por ser completamente desprovida de uma sequência de aminoácido NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO:11), correspondente aos aminoácidos 714 a 740 do fator VIII humano como ilustrado na Fig. 2 ou aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8.

[0058] Ainda em uma modalidade adicional, a variante de FVIII da invenção compreende a sequência de SEQ ID NO:3, ou uma variante da mesma compreendendo uma sequência sendo pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 3. Novamente, a variante é compreendida por ser completamente desprovida de uma sequência de aminoácido NIDDYYEDTYEDIPTPLLNNENNVIKPR (SEQ ID NO: 12) correspondente aos aminoácidos 714 a 740 do fator VIII canino como ilustrado na Fig. 2 ou aminoácidos 708 a 734 de SEQ ID NO: 9.

[0059] As variantes de FVIII da invenção também podem compreender as sequências que são pelo menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 ou 99,9% idênticas às sequências de SEQ ID NO: 7, 8 ou 9.

[0060] Para determinar o percentual de identidade de dois polipeptídeos/proteínas, as sequências de aminoácido são alinhadas para fins da comparação ideal (por exemplo, lacunas podem ser introduzidas na sequência de uma primeira sequência de aminoácido para o alinhamento ideal com uma segunda sequência de aminoácido). Os resíduos de aminoácido nas posições de aminoácido correspondentes são comparados então. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido

que a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas nessa posição. A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número das posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de identidade = # de posições idênticas / # total de posições (por exemplo, (posições sobrepostas) x 100).

[0061] A determinação de uma identidade percentual entre as duas sequências pode ser realizada usando um algoritmo matemático. Um exemplo preferido, não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificada como em Karlin e Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. As buscas do nucleotídeo BLAST podem ser executadas com o programa NBLAST, pontuação=100, comprimento da palavra=12 para obter as sequências de nucleotídeo homólogas às moléculas de um ácido nucleico da invenção. As buscas da variante BLAST podem ser executadas com o programa XBLAST, pontuação=50, comprimento da palavra=3 para obter as sequências de aminoácido homólogas às moléculas variantes da invenção. Para obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, PSI-Blast pode ser usado para executar uma busca repetida que detecta relações entre as moléculas. Ao utilizar os programas BLAST, Gapped BLAST e PSI-Blast, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Outro exemplo preferido, não-limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação das sequências é o algoritmo de Myers e Miller, (1988) CABIOS 4: 1 1-17. Tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que é parte do pacote do software de alinhamento de sequência GCG. Ao utilizar o programa ALIGN

para comparar as sequências de aminoácido, uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12, e uma penalidade de lacuna de 4 podem ser usadas. Ainda outro algoritmo útil para identificar as regiões de similaridade de sequência local e alinhamento é o algoritmo FASTA como descrito em Pearson e Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448. Ao usar o algoritmo FASTA para comparar as sequências de nucleotídeo ou de aminoácido, uma tabela de resíduo de peso PAM120 pode, por exemplo, ser usada com um valor de k tupla de 2.

[0062] A identidade percentual entre duas sequências pode ser determinada usando as técnicas similares àquelas descritas acima, com ou sem a permissão de lacunas. No cálculo da identidade percentual, somente correspondências exatas são contadas.

[0063] A variante de FVIII da invenção pode ser parcialmente ou inteiramente deletada do domínio B. Isto significa que ou todo o domínio B é deletado, ou uma parte do domínio B é mantida na variante de FVIII. A parte (retida) restante do domínio B é, por exemplo, selecionada dos 20, 15, 12, 10 ou 5 aminoácidos N-terminais e dos 20, 15, 12, 10 ou 5 aminoácidos C-terminais do domínio B, fundidos no quadro uns aos outros.

[0064] Daqui, preferivelmente, nas variantes de FVIII parcialmente deletadas do domínio B da invenção, as porções significativas do domínio B de aproximadamente 900 aminoácidos estão sendo removidas. Nas modalidades da invenção, menos de 5% ou menos de 4% ou menos de 3% ou menos de 2% ou menos de 1% do domínio B permanecem presentes nas variantes de FVIII.

[0065] Nas modalidades da invenção, a porção restante do domínio B é selecionada de uma sequência consistindo na SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6.

[0066] Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo/proteína como descrito acima.

Um polinucleotídeo pode ser uma molécula de RNA ou de DNA cuja sequência de nucleotídeo incorpora a informação de codificação a uma célula hospedeira para a sequência de aminoácido da variante da invenção, de acordo com as relações conhecidas do código genético.

[0067] Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo como descrito acima.

[0068] Um “vetor de expressão” é um elemento de DNA, muitas vezes de estrutura circular, tendo a capacidade de replicar autonomamente em uma célula hospedeira desejada, ou para se integrar em um genoma da célula hospedeira e também possuindo determinadas características bem conhecidas que permitem a expressão de um DNA de codificação inserido na sequência do vetor no local adequado e na orientação adequada. Tais características podem incluir, mas não são limitadas a, uma ou mais sequências promotoras para direcionar a iniciação da transcrição do DNA de codificação e outros elementos de DNA como intensificadores, locais de poliadenilação e similares, todos como bem conhecidos na técnica. O termo “vetor de expressão” é usado para denotar tanto um vetor tendo uma sequência de codificação de DNA a ser expressa inserida dentro de sua sequência, e um vetor tendo os elementos de controle de expressão necessários assim dispostos com relação a um local de inserção que pode servir para expressar qualquer DNA de codificação inserido no local, todos como bem conhecidos na técnica. Então, por exemplo, um vetor que não tem um promotor pode se tornar um vetor de expressão pela inserção de um promotor combinado com um DNA de codificação. Um vetor de expressão, como usado aqui, também pode ser um vetor viral.

[0069] A expressão das variantes de FVIII recombinantes da invenção é de preferência realizada na cultura da célula de mamífero.

[0070] Portanto, em um aspecto adicional, a invenção refere-se a uma célula de mamífero compreendendo um vetor de expressão como descrito

acima. Por exemplo, células de CHO (ovário do hamster Chinês) e células BHK (células do rim do hamster bebê) são células de mamífero que são células hospedeiras adequadas no contexto da presente invenção.

[0071] De acordo com outro aspecto da invenção, um método para produzir uma variante de FVIII da invenção compreende as etapas de:

- a. Cultivar uma célula de mamífero como descrito acima; e
- b. Isolar da célula de mamífero a variante de FVIII.

[0072] Em uma modalidade, o método compreende ainda a etapa de

- c. Formular a variante do fator VIII junto com excipientes adequados em uma composição farmacêutica.

[0073] Excipientes adequados para administração humana e animal são, por exemplo, compostos de estabilização farmacêutica, preservativos, veículos de liberação, e/ou veículos transportadores. Uma formulação adequada para produtos do fator VIII é por exemplo, descrita na WO 03/080108, que é incorporada aqui a título de referência.

[0074] Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo uma variante de FVIII da invenção.

[0075] Um aspecto adicional da invenção se refere a um método para tratar um paciente que sofre da deficiência do fator VIII compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de FVIII da invenção a um paciente em necessidade do mesmo, dessa forma tratando a deficiência do fator VIII no dito paciente.

[0076] O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” como usado aqui, significa o nível de FVIII no plasma de um paciente tendo deficiência de FVIII, que recebeu uma composição farmacêutica da variante de FVIII, que é suficiente para exibir uma melhoria mensurável ou efeito protetor no paciente (por exemplo, para interromper o sangramento). Os pacientes tendo deficiência de FVIII são tipicamente pacientes com hemofilia congênita A, mas também incluem aqueles indivíduos diagnosticados com a “hemofilia

adquirida”, uma condição na qual aqueles que não são hemofílicos congênitos desenvolvem espontaneamente anticorpos inibidores ao seu FVIII, criando uma deficiência de FVIII séria.

[0077] A invenção também refere-se a uma variante de FVIII da invenção para uso no tratamento da deficiência do fator VIII.

[0078] O tratamento pode tomar a forma de uma administração intravenosa única da composição ou administração periódica ou contínua durante um período de tempo prolongado, como necessário. De preferência, a administração de uma variante de FVIII é pela rota intravenosa.

[0079] “Deficiência do fator VIII,” como usado aqui, inclui a deficiência na atividade de coagulação causada pela produção do fator VIII defeituoso, pela produção inadequada ou nenhuma produção do fator VIII, ou pela inibição parcial ou total do fator VIII pelos inibidores. A hemofilia A é um tipo de deficiência do fator VIII resultante de um defeito em um gene ligado a X e a ausência ou deficiência da variante do fator VIII que este codifica.

[0080] As variantes de FVIII da invenção são usadas para tratar o sangramento descontrolado devido à deficiência do fator VIII (por exemplo, hemorragia intra-articular, intracraniana, ou gastrointestinal) em hemofílicos.

[0081] Em uma modalidade da invenção, a deficiência do fator VIII é hemofilia A.

[0082] Em outra modalidade, a deficiência do fator VIII é hemofilia adquirida.

[0083] Em uma modalidade, a deficiência do fator VIII é tratada em pacientes tendo os anticorpos de FVIII humanos desenvolvidos.

[0084] Como mencionado acima, as variante de FVIII da invenção tem atividade específica aumentada. É, portanto, possível administrar quantidades reduzidas da variante de FVIII a fim de tratar a deficiência de VIII de acordo com a presente invenção. As quantidades da variante de FVIII podem ser reduzidas por pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%

em comparação à terapia com um produto de FVIII que não contém a deleção de até 27 aminoácidos da invenção.

[0085] A redução da quantidade da terapia da variante de FVIII tem as vantagens da imunogenicidade reduzida esperada, isto é, espera-se que a probabilidade da geração de anticorpos inibidores contra a terapia de substituição de FVIII no paciente é significativamente reduzida.

[0086] Em uma modalidade, uma variante do fator VIII da invenção é administrada em uma quantidade de não mais que 200 µg de dose ou 150 µg de dose ou 145 µg de dose ou 140 µg de dose ou 136 µg de dose ou 130 µg de dose.

[0087] Tendo agora descrito inteiramente esta invenção, será apreciado por aqueles versados na técnica que a mesma pode ser executada dentro de uma ampla faixa de parâmetros, concentrações e circunstâncias equivalentes sem partir do espírito e escopo da invenção e sem a experimentação imprópria.

[0088] Embora esta invenção tenha sido descrita em relação às modalidades específicas da mesma, compreender-se-á que ela é capaz de modificações adicionais. Este pedido destina-se a cobrir todas as variações, usos ou adaptações da invenção a seguir, no general, os princípios da invenção e incluindo tais partidas da presente divulgação como vinda dentro da prática conhecida ou habitual dentro da técnica a qual a invenção pertence e como pode ser aplicada às características essenciais determinadas acima como segue no escopo das reivindicações anexas.

[0089] Todas as referências citadas aqui, incluindo artigos de jornal ou resumos, pedidos de patente US ou estrangeiros publicados ou não publicados, patentes US ou estrangeiras emitidas ou quaisquer outras referências, são incorporadas inteiramente por referência aqui, incluindo todos os dados, tabelas, figuras e texto apresentados nas referências citadas. Adicionalmente, todos os conteúdos das referências citadas dentro das referências citadas aqui são incorporados também inteiramente por referência.

[0090] A referência às etapas do método conhecidas, as etapas dos métodos convencionais, os métodos conhecidos ou métodos convencionais não são de maneira nenhuma uma admissão de que qualquer aspecto, descrição ou modalidade da presente invenção sejam divulgados, ensinados ou sugeridos na técnica relevante.

[0091] A descrição antecedente das modalidades específicas revelará assim inteiramente a natureza geral da invenção que os outros podem, pela aplicação do conhecimento dentro da habilidade da técnica (incluindo os teores das referências citadas aqui), para modificar e/ou adaptar prontamente para várias aplicações tais modalidades específicas, sem experimentação indevida, sem partir do conceito geral da presente invenção. Consequentemente, tais adaptações e modificações são destinadas a estarem dentro do significado de uma gama de equivalentes das modalidades divulgadas, com base nos ensinamentos e na orientação apresentados aqui. Deve ser compreendido que a fraseologia ou a terminologia aqui é para a finalidade da descrição e não de limitação, tal que a terminologia ou a fraseologia da presente especificação deve ser interpretada pela pessoa versada na técnica a luz dos ensinamentos e da orientação apresentada aqui, em combinação com o conhecimento de uma pessoa versada na técnica.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Expressão do FVIII parcialmente deletado do domínio B porcino recombinante (OBI-1) e isolamento das três proteínas variantes (rpVIII v1, v2 e v3)

[0092] A expressão do OBI-1 em células BHK foi realizada essencialmente como descrito na US 6.458.563. Três variantes foram detectadas no material produzido (rpVIII v1, v2 e v3). As variantes foram isoladas e purificadas para >95% de pureza na cromatografia de troca iônica. Para a purificação, um sistema AKTA Explorer (AKTA Explorer 10, GE Healthcare Lifesciences # 17-5167-01) usando uma coluna de troca aniônica

semipreparativa MonoQ HR10/10 (agora Mono Q 10/100 GL, GE Healthcare Lifesciences # 17-5167-01) foi usada. A eluição foi realizada em uma gradiente com os dois tampões a seguir:

Tampão A: 10 mM TRIS, pH 7,0, Polissorbato 80 a 0,01%.

Tampão B: Tampão A e cloreto de sódio a 1 M.

[0093] As características do método de purificação são resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Método de Purificação da Variante rpFVIII

| Método AKTA | LoopMQ1010 | |
|----------------------|-----------------------|-----|
| Fluxo | 4 ml/min | |
| Coluna de Equilíbrio | 8 CV | |
| Fluxo de carga | 4 ml/min | |
| Volume da Amostra | 40 – 1000 ml | |
| Coluna de lavagem | 10 CV | |
| Gradiente | Volume da Coluna (CV) | %B |
| | 7 | 45 |
| | 4 | 50 |
| | 4 | 50 |
| | 6 | 52 |
| | 4 | 52 |
| | 2 | 55 |
| | 7 | 60 |
| | 1 | 65 |
| | 5 | 65 |
| | 1 | 70 |
| | 5 | 70 |
| | 1 | 100 |
| | 7 | 100 |
| | 1 | 10 |
| | 4 | 10 |
| | | |
| Passagem Total | 59 CV | |
| Temp. da Coluna | Não controlada | |

Exemplo 2: Variante 3 (rpVIIIv3) tem uma atividade específica significativamente mais alta do que as variantes 1 e 2

[0094] A atividade específica de cada variante foi avaliada pela divisão da potência avaliada pelo ensaio de coagulação de um estágio (OSCA) pela concentração de proteína como medida pela SEC HPLC por método. Os métodos de OSCA e SEC HPLC foram realizados como descrito

nos “Materiais e Métodos” do Exemplo 5.

RESULTADOS

[0095] Os resultados para as atividades específicas são indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Atividades Específicas (método OSCA) para as Variantes Purificadas 1, 2 e 3 obtidas a partir de dois lotes diferentes de rpFVIII

| Amostra com base em SEC | OSCA Unidades/ml | % de RSD* | Atividade Específica Unidades/ml | % de RSD* |
|-------------------------|------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| V1 - lote1 | 1060 | 1,5 | 11956 | 1,7 |
| V2 - lote1 | 715 | 2,7 | 17267 | 3,3 |
| V3 - lote1 | 216 | 1,2 | 25926 | 2,8 |
| OBI-1 | 513 | 1 | 18150 | 1,3 |
| | | | | |
| V1 – lote2 | 980 | 1,2 | 12532 | 1,5 |
| V2 – lote2 | 613 | 0,6 | 16089 | 1,3 |
| V3 – lote2 | 280 | 2,9 | 19718 | 4,1 |
| OBI-1 | 565 | 4,0 | 14427 | 4,4 |

*desvio padrão relativo

[0096] A observação da atividade específica significativamente mais alta para a variante 3 no ensaio OSCA é distinta e consistente. Já que o método OSCA é indicativo e representativo para o processo de coagulação em humanos, espera-se que a variante 3 é um produto de valor significativo. Espera-se que o aumento de 1,5 a 2,0 vezes na potência reduz a quantidade de FVIII administrado aos pacientes e deve, portanto, indiretamente reduzir a ocorrência dos efeitos colaterais imunológicos.

Exemplo 3: Determinação da sequência de rpFVIIIv3

[0097] A sequência do v3 purificada foi determinada pelo mapa de peptídeo seguida pela LCMS (espectrometria de massa de cromatografia líquida) e LCMS/MS (espectrometria de massa de cromatografia líquida/espectrometria de massa) em um Q-TOF Ultima Mass Spectrometer, executando MassLynx 4.0 (Waters Corporation, Milford, MA).

[0098] Aproximadamente 250 µg da Variante 3 foram concentrados usando um concentrador Amicon, Centricon YM-10 com um filtro 10,000

MWCO (Millipore Corporation, Billerica, MA) para um volume de < 100 µL. As amostras foram misturadas com 450 µL de 6 M guanidina HCl/0,002 M EDTA (ácido etilenodiaminatetra-acético)/0,02 M Tris tampão pH 8 e transferidas para tubos de polipropileno de 2,0 mL. 1 M DTT (ditiotreitól) foi adicionada a cada amostra para uma concentração final de 10 mM e incubado por 1 hora a 37°C. Após a redução, 2M iodoacetamida foi adicionado a cada tubo para uma concentração final de 20 mM e incubado por mais uma hora a temperatura ambiente. As amostras reduzidas e alquiladas foram transferidas para cassetes de diálise e dialisados por 1 hora contra 1L de 50 mM de tampão de diálise de bicarbonato de amônio contendo 1,0 M de uréia, pH 8. As amostras foram então dialisadas contra 1L do tampão de diálise durante a noite a temperatura ambiente enquanto mantém agitação constante. Após a diálise os volumes finais foram aproximadamente 0,5 mL cada. As amostras foram divididas em duas alíquotas de 125 µg.

[0099] Após a diálise, a amostra de proteína foi contida em uma matriz que é ideal para a digestão proteolítica com tripsina. A tripsina foi adicionada a cada amostra a uma razão de enzima para substrato de 1:20 (p:p) e incubada por 8 horas a 37°C. Todas as amostras foram transferidas para frascos de HPLC e analisadas por HPLC-MS.

[00100] A proteína reduzida e alquilada foi injetada em uma coluna de fase reversa Vydac C18 (Grace, Deerfield, IL). Antes da injeção da amostra, uma amostra em branco (Fase Móvel A; água deionizada contendo 0,2% (v:v) de ácido fórmico) foi analisada para equilibrar a coluna e demonstrar a ausência de picos de interferência.

[00101] Os dados de espectrometria de massa foram coletados em um espectrômetro de massa Q-TOF API-US ou um espectrômetro de massa Q-TOF Ultima (Waters Corporation, Milford, MA) usando a ionização por eletrospray (ESI) no modo de íon positivo. Antes da análise da amostra, o espectrômetro de massa foi calibrado usando um ajuste de 5ª ordem nos íons

do fragmento do Peptídeo de Glu-Fibrinogênio cobrindo uma faixa de 175 a 1285 m/z. Para a calibração passar as especificações, um erro RMS (média quadrática) para a massa dos fragmentos de peptídeo menor que 5 ppm foi necessário. O pacote de software Masslynx 4.0™ SP2 e SP4 (Waters Corporation, Milford, MA) foram usados para a aquisição de dados e análise.

[00102] Tanto dados de MS quanto de MS/MS foram coletados usando uma única execução de cromatografia líquida (LC). As varreduras da pesquisa do espectrômetro de massa (MS) completas foram coletadas a partir de 200-1950 m/z.

[00103] A sequência de rpFVIII foi determinada para corresponder à SEQ ID NO:1. Esta sequência contém uma deleção de 27 aminoácidos em comparação com a sequência de OBI-1.

Exemplo 4: rpFVIIIv3 teve uma atividade específica mais alta do que outros produtos de FVIII conhecidos

[00104] A atividade específica de rpFVIIIv3 foi comparada a três produtos de FVIII disponíveis comercialmente, a saber Xynthia® (um FVIII humano deletado do domínio B recombinante da Wyeth Pharmaceuticals (Philadelphia, PA)), Kogenate FS® (um FVIII humano de comprimento completo da Bayer Healthcare (Tarrytown, NY)) e Advate® (um FVIII humano de comprimento completo da Baxter (Westlake Village, CA)), assim como a OBI-1 (um FVIII porcino parcialmente deletado do domínio B recombinante), que está atualmente sob desenvolvimento clínico, e um fator VIII canino deletado do domínio B (Denise E. Sabatino et.al., Recombinant canine B-domain-deleted FVIII exhibits high specific activity and is safe in the canine hemophilia A model, Blood, 12 November 2009, Vol. 114, No. 20, pp. 4562-4565).

[00105] A atividade específica de OBI-1 e rpFVIIIv3 foi determinada pelos métodos como descrito no Exemplo 5.

[00106] Os resultados são ilustrados na Tabela 3 e Fig. 1. Devido a suas

atividades específicas aumentadas, quantidades inferiores de rpVIIIv3 por dose podem ser administradas a um paciente. Espera-se que esta diminuição na dose levará a uma imunogenicidade reduzida, isto é, resulta em uma probabilidade menor de que os pacientes desenvolvam anticorpos inibidores.

Tabela 3: Atividades específicas dos produtos de FVIII em comparação a rpVIIIv3

| | Atividade Específica em IU/mg de Proteína | Proteína Amt µg/dose [^] |
|----------------------|---|-----------------------------------|
| Xynthia | 7500 | 400 |
| Kogenate FS | 4000 | 750 |
| Advate | 4000 | 750 |
| | | |
| OBI-1 | 11000 | 273 |
| rpVIIIv3 | 22000 | 136 |
| | | |
| BDD* FVIII de Canino | 34000 | 88 |

[^] Proteína Amt = xxxx µg/dose. Os números mostrados na coluna para rpVIII3 significam que uma quantidade de 136 µg por dose será necessária. Uma dose é a quantidade necessária para elevar o nível do fator VIII do sangue de 0% a 100%, isto é, quanto maior a atividade específica (XXX unidade/mg), menor quantidade (em termos de µg) é necessária. Note que 1 mg = 1000 µg. Dado que uma dose típica é 3000 unidades por paciente, a quantidade da proteína real necessária = $3000/22000 = 0,136 \text{ mg} = 136 \text{ µg}$.

*BDD significa o domínio B deletado e FL significa o comprimento completo.

[00107] Em conclusão, estes resultados mostram que rpVIIIv3 tem uma atividade específica significativamente mais alta do que os produtos testados que são comercializados atualmente, ou sob desenvolvimento clínico, para a terapia de substituição de FVIII.

[00108] Em particular, é altamente surpreendendo uma deleção de 27 aminoácidos, presente em rpVIIIv3 mas não em OBI-1, que leva a um aumento de 50% na atividade específica (como medida pelo ensaio OSCA).

Exemplo 5: Materiais e Métodos

ENSAIO DE COAGULAÇÃO DE UM ESTÁGIO - OSCA -
MÉTODO

[00109] 1. Diluir o Padrão de Referência no Tampão do Ensaio (10% do plasma deficiente em Fator VIII + Tampão Veronal de Owren, por litro, 28 mmol de barbital de sódio e 125 mmol de NaCl, pH 7,35) para a potência alvo de 1,0 unidade/mL.

[00110] 2. Diluir os padrões de verificação, controles de atividade e amostras no Tampão de Ensaio para a potência alvo.

[00111] 3. Carregar o padrão de calibração (referência) e reagentes nos poços adequados dentro de um instrumento Sympor exemplo (Sysmex CA-1500, Analisador de Coagulação, Dade Behring # B4260-1500 (Siemens Corporation, Deerfield, IL)).

[00112] 4. Carregar o padrão de verificação, controles e amostras em prateleiras fora do instrumento Sysmex.

[00113] 5. A sequência do ensaio ocorre automaticamente dentro do instrumento como segue:

a. 5 uL da amostra é diluída em 45 ul do tampão de ensaio dentro do tubo de reação

b. 50 uL do plasma deficiente em fator VIII é adicionado ao tubo de reação

c. 50ul de reagente do tempo de tromboplastina parcial ativado Dade Actin FS (fosfatídeos de soja purificados em $1,0 \times 10^{-4}M$ do ativador de ácido Ellagic, Dade Behring, Liederbach, Germany) são adicionados ao tubo de reação e incubado por 60 segundos.

d. 50ul de Cloreto de Cálcio (0,025M, Dade Behring, Liederbach, Germany) são adicionados ao tubo de reação e incubados por 240 segundos.

e. O tempo de coagulação é medido até um tempo máximo de 300 segundos.

[00114] 6. O tempo de coagulação é, então, correlacionado à potência

gerada pela curva de calibração padrão de referência.

MÉTODO DE HPLC POR EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC)

[00115] Um sistema Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) ou um Waters Bioalliance HPLC (Waters Corporation, Milford, MA) foi e é tipicamente usado para o método por exclusão de tamanho para a determinação da concentração de proteína. A coluna por exclusão de tamanho típica usada foi uma Superdex 200 da GE (Superdex 200 10.300 GL, 10 X 300 mm, Cat # 17-5175-01 (GE Healthcare Lifesciences, Piscataway, NJ)). Um protocolo de ensaio geral é como segue:

1. Uma fase móvel típica foi preparada que continha 400mM de NaCl com 20mM de TRIS, pH 7,4 e 0,01% de polissorbato 80.
2. A fase móvel foi executada através do sistema HPLC e coluna até o equilíbrio da linha base ser observado.
3. Os padrões foram executados para estabelecer o sistema adequadamente com um tempo de execução típico de 30 minutos para cada amostra.
4. As amostras foram tipicamente carregadas sobre um auto amostrador com uma temperatura de câmara de controle de 4°C.
5. Um padrão de calibração de concentrações conhecidas contendo várias quantidades das amostras padrão, tipicamente de 1, 3, 5, 10 e 25 µg de proteína foram carregadas na coluna em volumes entre 10 a 50 µl.
6. Amostras de concentrações conhecidas também foram carregadas nas colunas tipicamente em volumes entre 30 a 50 µl.
7. O sistema de HPLC foi programado para executar as amostras automaticamente de acordo com a sequência definida.
8. A área de pico dos padrões de calibração e as amostras desconhecidas foram determinadas com base na detecção de fluorescência com excitação e emissão a 280nm e 340nm respectivamente.
9. Uma regressão linear dos padrões de calibração foi gerada e

a concentração da amostra desconhecida foi determinada contra esta curva de calibração.

[00116] Um exemplo típico do perfil SEC dos padrões de calibração e a regressão linear da curva de calibração são mostrados na Figura 3.

Exemplo 6: Ligação ao Fator de von Willebrand

[00117] O fator de Von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína multifuncional que circula no plasma como uma forma multimérica complexada com o Fator VIII (complexo FVIII/vWF). O complexo FVIII/vWF serve para proteger o FVIII ligado da proteólise precoce na circulação in vivo.

[00118] A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) é usada para caracterizar a ligação em complexos FVIII/vWF. Uma coluna de Superose 6 (Superose 6 10/300GL, GE Healthcare #17-5172-01, vazão = 0,5 mL/min) foi selecionada por sua biocompatibilidade conhecida e alto limite de exclusão de 40 milhões de Daltons (tampão da formulação da fase móvel: 2 mM e CaCl₂, 10 mM de Tris pH 7,0, 300 mM de NaCl, 0,01% de PSB-80, 11 mM de sacarose, 10 mM de citrato de trissódio). As diferenças no peso molecular entre o fator de von Willebrand (dimérico @ ~ 500KD, Fitzgerald Cat# 30C-CP4003U, Lote # A09121050, Peso Mol. Do Monômero = ~260kD, Conc. = 77 µg/mL) e rpFVIII (~ 160 KD) é suficiente para determinar as duas espécies.

[00119] A estequiometria da ligação foi determinada pela titulação da quantidade constante de vWF com quantidades crescentes de rpFVIII. O perfil da formação de complexação entre rpFVIII e vWF foi determinado a partir do cromatograma SEC e a integração de picos apropriados. A forma solúvel das misturas resultantes no sobrenadante foram usadas para determinar o ponto final da complexação a partir da titulação com quantidades crescentes de rpFVIII. Os complexos maiores, estáveis formados entre rpFVIII e vWF migram a partir do tempo de retenção normal para o limite de exclusão da coluna. Quando a saturação ocorre, quantidades

crescentes de rpFVIII não ligado serão observadas no cromatograma de SEC. Este método é usado para distinguir diferenças e similaridades nas propriedades das variantes.

Exemplo 7: Cinética da Digestão de Trombina

SDS-PAGE

[00120] As moléculas de fator VIII porcino (rpFVIII) recombinantes são heterodímeros de aproximadamente 160kD compostos de uma cadeia leve de peso molecular 78,5kD (A3-C1-C2, 765-1448) e uma cadeia pesada variando em peso molecular de 86,7kD (A1-A2). A cadeia pesada de rpFVIII é heterogênea e composta de três variantes principais que são formadas mediante a secreção da célula e podem ser clivadas pelas proteases ligadas a membrana da família subtilisina designadas PACE (Enzima de Clivagem de Aminoácido Básica Pareada).

[00121] Como o fator VIII humano, o rpFVIII é transformado em uma forma ativa pela proteólise limitada a partir a trombina. A ativação da trombina de rpFVIII é específica para o local de clivagem da cadeia pesada em Arg(372)-Ser(373). A região de clivagem para a Cadeia Leve na Arg(805)-Ser(806) libera uma pequena fração de peptídeo de 40 aminoácidos variando de 765-804 (~4,4kD). A combinação destas clivagens iniciais pela trombina forma o fator VIII porcino recombinante ativado como um heterodímero das subunidades designadas como A1 (~50kD), A2 (~40kD), e A3-C1-C2 (~70kD). O rpFVIII A1 clivado e subunidades A3-C1-C2 mantém a ligação dependente de íon de metal divalente, enquanto que a subunidade A2 é fracamente associada com o dímero A1-A3-C1-C2 pelas interações eletrostáticas primárias. No SDS-PAGE, estas subunidades são exibidas como três bandas distintas. A eficiência na conversão de rpFVIII (2 unidades de peptídeo) para três unidades de peptídeo é característica da ativação de trombina do produto. Este método distingue as similaridades e diferenças entre as variantes individuais.

[00122] Dois outros métodos ortogonais podem ser e foram usados para mapear a cinética da digestão da trombina do FVIII. A HPLC de fase reversa de desnaturação pode ser usada; espera-se que os perfis de pico sejam similares àqueles de SDS-PAGE. A cromatografia de troca aniônica, que mantém a forma nativa dos peptídeos, também pode ser usada.

HPLC de Fase Reversa

[00123] Equipamento:

1. HPLC 1100 series: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; N° do modelo 61312A, N° de série DE10907753.

2. Coluna de 5um 2,1 X 75mm Poroshell: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; N° da peça 660750-909, N° de série USVV001988.

[00124] Reagentes:

1. Tampão A: 0,1% de TFA (JT B Baker, Phillisburg, NJ; N° do Cat. 94700-00, N° do Lote J23J00) em água.

2. Tampão B: 0,1% de TFA em Acetonitrila (JT Baker, Phillisburg, NJ; N° do Cat. 9017-03, N° do Lote J38807).

[00125] Procedimento:

1. Equilibrar a coluna por 60 minutos usando 99% de A e 1% de B a 1 ml/min.

2. As injeções da amostra foram 50µl em volume; 25 µl do padrão de referência foram usados como controle.

3. Um exemplo do método usado para executar as amostras é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4:

| Injeção | Tempo (min) | Fluxo (ml/min) | % de A | % de B |
|---------|-------------|----------------|--------|--------|
| 1 | 0,00 | 2 | 99 | 1 |
| 2 | 2,00 | 2 | 99 | 1 |
| 3 | 3,00 | 2 | 64 | 36 |
| 4 | 3,50 | 2 | 64 | 36 |
| 5 | 4,00 | 2 | 61 | 39 |
| 6 | 5,00 | 2 | 61 | 39 |
| 7 | 5,10 | 2 | 58 | 42 |
| 8 | 6,50 | 2 | 58 | 42 |
| 9 | 6,51 | 2 | 56 | 44 |
| 10 | 7,20 | 2 | 56 | 44 |
| 11 | 7,21 | 2 | 40 | 60 |
| 12 | 8,50 | 2 | 40 | 60 |
| 13 | 8,51 | 2 | 10 | 90 |
| 14 | 9,00 | 2 | 10 | 90 |
| 15 | 9,10 | 2 | 99 | 1 |
| 16 | 10,00 | 2 | 99 | 1 |

Cromatografia de Troca Aniônica

[00126] Equipamento:

1. AllianceBio HPLC, Waters corporation, Milford, MA, USA; N° do modelo 2796; N° de série M08BA1199M.

2. Coluna de proteína Pak Hi Res Q 5um 4,6X100mm: Waters Corporation, Milford, MA, USA; N° da peça 186004931, N° de série 502N112561VE04.

[00127] Reagentes:

Tampão A:

10mM de base Tris (1,211g/L)

2mM de Cloreto de Cálcio (0,588g/L)

0,01% de polissorbato 80 (1 ml de 10% de PS-80/L)

Água filtrada até 1 L, pH 7,0

Tampão B:

10mM de base Tris (1,211 g/L)

2mM de Cloreto de Cálcio (0,588 g/L)

0,01% de polissorbato 80 (1 ml de 10% PS-80/L)

Cloreto de sódio 1 M (58,44g/L)

Água filtrada até 1 L, pH 7,0

[00128] Procedimento:

1. Equilibrar a coluna por 60 min usando 70% de A e 30% de B a 0,5 ml/min.

2. As injeções da amostra foram de 50µl em volume; 10 µl do padrão de referência usado como controle.

3. Um exemplo do método usado para executar as amostras é mostrado na Tabela 5.

Tabela 5:

| Injeção | Tempo (min) | Fluxo (ml/min) | % de A | % de B |
|---------|-------------|----------------|--------|--------|
| 1 | 0,01 | 0,5 | 70 | 30 |
| 2 | 0,50 | 0,5 | 70 | 30 |
| 3 | 3,50 | 0,5 | 60 | 40 |
| 4 | 5,00 | 0,5 | 60 | 40 |
| 5 | 10,00 | 0,5 | 30 | 70 |
| 6 | 10,10 | 0,5 | 1 | 99 |
| 7 | 12,00 | 0,5 | 1 | 99 |
| 8 | 12,10 | 0,5 | 70 | 30 |
| 9 | 17,00 | 0,5 | 70 | 30 |

[00129] A pessoa versada na técnica saberia e apreciaria que estes e outros métodos podem ser usados para chegar à compreensão das proteínas do Fator VIII recombinante como descrito aqui.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de fator VIII (FVIII) porcino deletada de domínio B totalmente ou parcialmente recombinante e isolada, caracterizada pelo fato de que a variante de FVIII compreende uma sequência de aminoácido idêntica à SEQ ID NO: 1 e é desprovida de uma sequência de aminoácidos correspondente aos aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7.

2. Método para produzir uma variante de FVIII, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a. cultivar uma célula de mamífero que expressa a variante de FVIII como definida na reivindicação 1; e

b. isolar da célula de mamífero a variante de FVIII.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a etapa de:

c. formular a variante de fator VIII juntamente com excipientes adequados em uma composição farmacêutica.

4. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante de fator VIII como definida na reivindicação 1.

5. Uso da variante de FVIII como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para manufatura de um medicamento para tratar um paciente que sofre de hemofilia, em necessidade do mesmo.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita hemofilia é hemofilia A.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita hemofilia é hemofilia adquirida.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que a dita hemofilia é tratada em pacientes tendo desenvolvido anticorpos FVIII humanos.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que o fator VIII é administrado em uma quantidade

de 200 µg/dose ou menos.

10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que o fator VIII é administrado em uma quantidade de 150 µg/dose ou menos.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que o fator VIII é administrado em uma quantidade de 140 µg/dose ou menos.

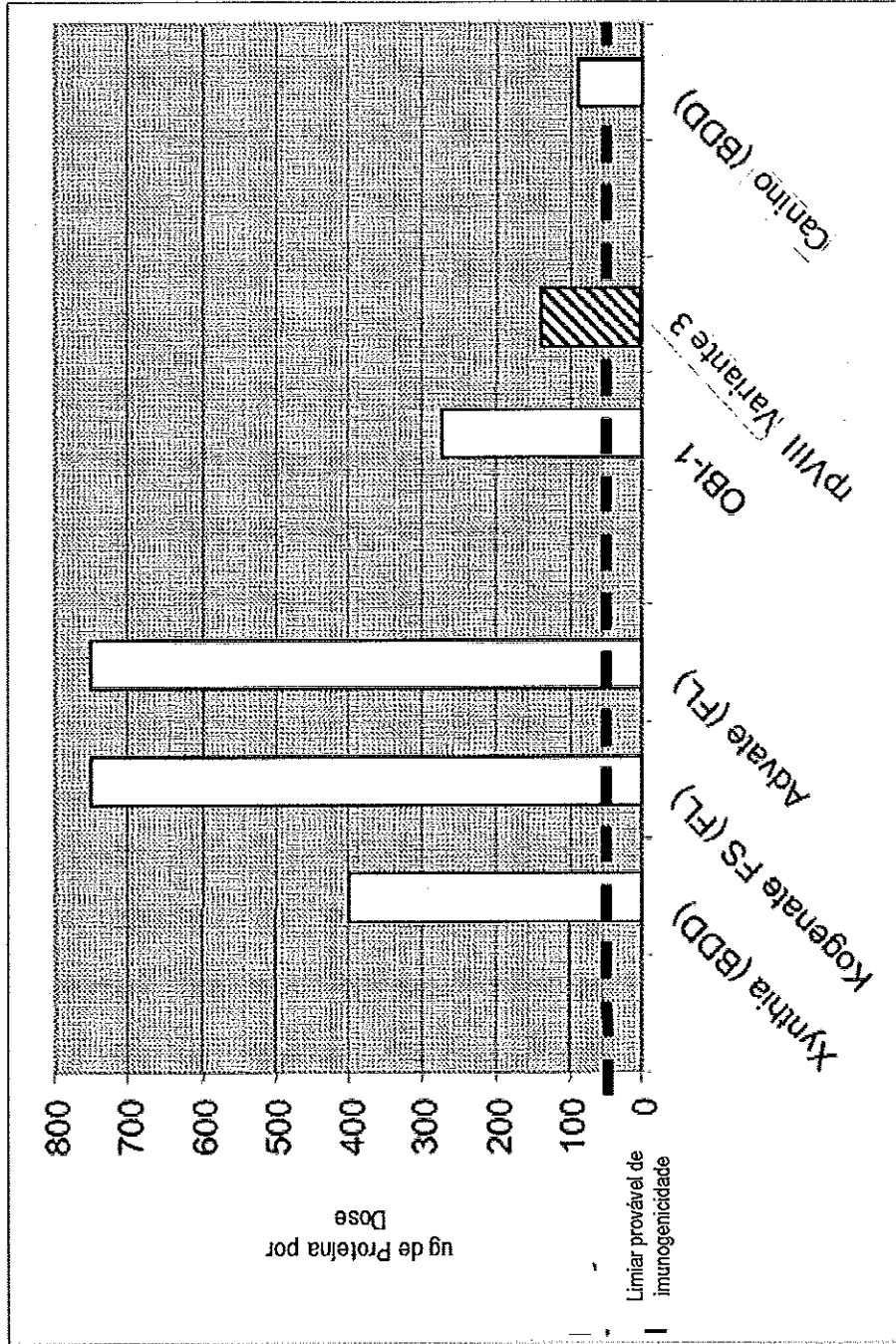


Fig. 1

| | | | | | |
|----------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | 1 | | | | 50 |
| HUMFVIII | ATRRYYLGAV | ELSWDYMOSD | .LGELPVDAR | FPPRVPKSFP | FNTSVVYKKT |
| PIGFVIII | AIRRYYLGA | ELSWDYRQSE | LLRELHVDTR | FPATAPGALP | LGPSVLYKKT |
| MURFVIII | AIRRYYLGA | ELSWNYIQSD | LLSVLHTDSR | FLPRMSTSPF | FNTSIMYKKT |
| CANFVIII | ATRKYYLGAV | ELSWDYMOSD | LLSALHADTS | FSSRVPGSLP | LTTSVYTRKT |
| | 51 | | | | 100 |
| HUMFVIII | LFVEFTDHLF | NIAKRPPPM | GLLGFTIQAE | VYDTVVITLK | NMASHPVSLH |
| PIGFVIII | VFVEFTDQLF | SVARPPPM | GLLGFTIQAE | VYDTVVVTLK | NMASHPVSLH |
| MURFVIII | VFVEYKQLF | NIAKRPPPM | GLLGFTIWFTE | VHDTVVITLK | NMASHPVSLH |
| CANFVIII | VFVEFTDDL | NIAKRPPPM | GLLGFTIQAE | VYDTVVIVLK | NMASHPVSLH |
| | 101 | | | | 150 |
| HUMFVIII | AVGVSYWKAS | EGAEDDQTS | QREKEDDKVF | PGGSHTYVWQ | VLKENGPMAS |
| PIGFVIII | AVGVSEWKS | EGAEDDQTS | QREKEDDKVL | PGKSQTYVWQ | VLKENGPTAS |
| MURFVIII | AVGVSYWKAS | EGDEYDQTS | QMEKEDDKVF | PGESHTYVWQ | VLKENGPMAS |
| CANFVIII | AVGVSYWKAS | EGAEDDQTS | QKEKEDDNI | PGESHTYVWQ | VLKENGPMAS |
| | 151 | | | | 200 |
| HUMFVIII | DFPCLTYSYL | SHVDLVKDLN | SGLIGALLVC | REGSLAKEKT | QTLHKPILLF |
| PIGFVIII | DPPCLTYSYL | SHVDLVKDLN | SGLIGALLVC | REGSLTRERT | QNLHEFVLLF |
| MURFVIII | DPPCLTYSYM | SHVDLVKDLN | SGLIGALLVC | KEGSLKERT | QMLYQVLLF |
| CANFVIII | DPPCLTYSYF | SHVDLVKDLN | SGLIGALLVC | KEGSLAKERT | QTLQEFVLLF |
| | 201 | | | | 250 |
| HUMFVIII | AVFDEGKSWH | SETKNSLMQD | RDAASARAWF | KMHTVNGYVN | RSLEGLIGCH |
| PIGFVIII | AVFDEGKSWH | SARNSWTRA | MDPAZARAQP | AMHTVNGYVN | RSLEGLIGCH |
| MURFVIII | AVFDEGKSWH | SETNSYTQS | MDSASARDWP | KMHTVNGYVN | RSLEGLIGCH |
| CANFVIII | AVFDEGKSWH | SETNASLTQ |AEAQH | ELHTINGYVN | RSLEPGLTVCH |
| | 251 | | | | 300 |
| HUMFVIII | RKSVYWHVIG | MGTTFEVHSI | FLEGHTFLVR | NHRQASLEIS | PITFLTAQTL |
| PIGFVIII | RKSVYWHVIG | MGTTFEVHSI | FLEGHTFLVR | HHRQASLEIS | PLTFLTAQTF |
| MURFVIII | RKSVYWHVIG | MGTTFEHSI | FLEGHTFFVR | NHRQASLEIS | PITFLTAQTL |
| CANFVIII | RKSVYWHVIG | MGTTFEVHSI | FLEGHTFLVR | NHRQASLEIS | PITFLTAQTF |
| | 301 | | | | 350 |
| HUMFVIII | LMDLGQFLLF | CHISSHQHDG | MEAYVKVDSC | PEEPQLRMK. | NNEEAEDYDD |
| PIGFVIII | LMDLGQFLLF | CHISSHHGG | MEAHVRVESC | AEEPQLRRK. | ADEE.EDYDD |
| MURFVIII | LIDLQFLLF | CHISSHKHDG | MEAYVKVDSC | PEESQWQKN | NNEEMEDYDD |
| CANFVIII | LMDLGQFLLF | CHIPSHQHDG | MEAYVKVDSC | PEEPQLRMK. | NNED.KDYDD |
| | 351 | | | | 400 |
| HUMFVIII | DLTDSEMDVV | RFDDNSPSF | IQIRSVAKKH | PKTWVHYIAA | EEEDWOYAPL |
| PIGFVIII | NLYDSDMDVV | RLDGDVSPF | IQIRSVAKKH | PKTWVHYISA | EEEDWOYAPA |
| MURFVIII | DLY.SEMDMF | TLDYD.SSPF | IQIRSVAKKY | PKTWVHYISA | EEEDWOYAPS |
| CANFVIII | GLYDSDMDVV | SFDDSSSPF | IQIRSVAKKH | PKTWVHYIAA | EEEDWOYAPS |
| | 401 | | | | 450 |
| HUMFVIII | VLAPDRSYK | SOYLNNGPQR | IGRKYKVR | MAYTDETFKT | REAIQHESGI |
| PIGFVIII | VPSFSDRSYK | SLYLSNGPQR | IGRKYKARF | VAYTDVTFKT | RKAIFYESGI |
| MURFVIII | VPTSDNGSYK | SOYLSNGPQR | IGRKYKVR | IAYTDETFKT | RETIQHESGL |
| CANFVIII | GPTFNDRSHK | NLYLNNGPQR | IGKYYKVR | VAYTDETFKT | REAIQYESGI |
| | 451 | | | | 500 |
| HUMFVIII | LGPLLYGEVG | DTLLIFKNQ | ASRPYNIYPH | GITDVRPLYS | RRLPKGVKHL |
| PIGFVIII | LGPLLYGEVG | DTLLIFKNK | ASRPYNIYPH | GITDVSALHP | GRLKGVKHL |
| MURFVIII | LGPLLYGEVG | DTLLIFKNQ | ASRPYNIYPH | GITDVSPLHA | RRLPRGIKHV |
| CANFVIII | LGPLLYGEVG | DTLLIFKNQ | ASRPYNIYPH | GINYVTPH | GRLPKGVKHL |
| | 501 | | | | 550 |

Fig. 2a

| | | | | | |
|----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| HUMFV888 | KDFPILFGEI | FKYKWTVTVE | DGPTKSDPRC | LTRYYSSEFW | MERDLASGLI |
| PIGFV888 | KDMPILFGET | FKYKWTVTVE | DGPTKSDPRC | LTRYYSSSIN | LEKDLASGLI |
| MURFV888 | KDLPIHFGEI | FKYKWTVTVE | DGPTKSDPRC | LTRYYSSEFW | PERDLASGLI |
| CANFV888 | KDMPILFGEI | FKYKWTVTVE | DGPTKSDPRC | LTRYYSSEFW | LERDLASGLI |
| | 551 | | | | 600 |
| HUMFV888 | GPLLCYKES | VDQRGNQIMS | DKRNVIKFSV | FDENRSWYLT | ENIQRFLEPN |
| PIGFV888 | GPLLCYKES | VDQRGNQIMS | DKRNVIKFSV | FDENQSWYLA | ENIQRFLEPN |
| MURFV888 | GPLLCYKES | VDQRGNQIMS | DKRNVIKFSI | FDENQSWYIT | ENMQRFLENA |
| CANFV888 | GPLLCYKES | VDQRGNQIMS | DKRNVIKFSV | FDENRSWYLT | ENMQRFLENA |
| | 601 | | | | 650 |
| HUMFV888 | AGVQLEDPEF | QASNIMHSIN | GYVFDLQLS | VCLHEVAYWY | ILSIGAQTFD |
| PIGFV888 | DGLQPDPEF | QASNIMHSIN | GYVFDLQLS | VCLHEVAYWY | ILSVGAQTFD |
| MURFV888 | AKTQPDPEF | QASNIMHSIN | GYVFDLQLS | VCLHEVAYWY | ILSVGAQTFD |
| CANFV888 | DVVQPHPEF | QASNIMHSIN | GYVFDLQLS | VCLHEVAYWY | ILSVGAQTFD |
| | 651 | | | | 700 |
| HUMFV888 | LSVFFSGYTF | KHKMVEDTL | TLFPPSGETV | FMSMENPGLW | ILGCHNSDFR |
| PIGFV888 | LSVFFSGYTF | KHKMVEDTL | TLFPPSGETV | FMSMENPGLW | VLGCHNSDLR |
| MURFV888 | LSIFFSGYTF | KHKMVEDTL | TLFPPSGETV | FMSMENPGLW | VLGCHNSDFR |
| CANFV888 | LSVFFSGYTF | KHKMVEDTL | TLFPPSGETV | FMSMENPGLW | VLGCHNSDFR |
| | 701 | | | | 730 |
| HUMFV888 | NRGMTALLKV | SSCDKNTGDY | YEDSYEDISA | YLLSKNNAIE | PRSESONSRH |
| PIGFV888 | NRGMTALLKV | YSCDRDIGDY | YDNTYEDIPG | FLLSGKNVIE | PRSESONSRH |
| MURFV888 | KRGMTALLKV | SSCDKSTSDY | YEEIYEDIPT | OLVNNENVID | PRSESONSRH |
| CANFV888 | NRGMTALLKV | SSCDKNIDDY | YEDTYEDIPT | PLLNENNVIK | PRSESONSRH |
| | 751 | | | | 800 |
| HUMFV888 | ITRQKQFNA | TTIPENDIEK | TDFWFAHRTF | MPKIQNVSSS | DLMLLRQS. |
| PIGFV888 | ITRQKQFQT | ITSPEDDVE. | LDQSGERTQ | ALEELSVPSG | DGSMMLLQON. |
| MURFV888 | ITRQKQKFKD | STIPKNDMEK | IEPQFEEIAE | MLKVQSVSVS | DMLMLLQOSH |
| CANFV888 | ITRQKQKQKA | TTIPENDIEK | IDLQSGERTQ | LIIKAQSVSSS | DLMLLRQS. |
| | 801 | | | | 850 |
| HUMFV888 | PTPHGLSLSD | LQEAKEYEFS | DDPSPGAIDS | NNSLSEMTFH | RFQLHHSQDM |
| PIGFV888 | FAPHG33SSD | LQEARNE.A | DDYLEGAREK | NTAF3AAARL | RFELHHSQER |
| MURFV888 | PTPHGLFLSD | QOEAIYEAIH | DDHSPNAIDS | NEGPKVTVQL | RPESHHSQKI |
| CANFV888 | PTPRGLFLSD | LREA.TDRA | DDHSRGAIER | NKGPPEVAQL | RFELRHSEDR |
| | 851 | | | | 900 |
| HUMFV888 | VFTPEGLQL | RLNEKLGTTA | ATELKKLDFK | VSSSTSHNLI. | STIPSDNLA |
| PIGFV888 | VLTPEPE... | | KELKKLDSK | MSSSDLLKT | SPTIFSDTLS |
| MURFV888 | VFTPQGLQL | RSNKSLETTI | EVKWKKLGLQ | VSSLESNLMT | TTILSDNLK |
| CANFV888 | EFTPEPELQL | RLNENLGTNT | TVELKKLDLK | ISSSDSLMT | SPTIPSDKLA |
| | 901 | | | | 950 |
| HUMFV888 | AGTDNTSSLG | PPSMFVHYDS | QLDITLFGKK | SSPLTESGGP | LSLSEENNDS |
| PIGFV888 | AETERHSLG | PPHPQVNFES | QLGAVLCKN | SSHFIGAGVF | LGSTEED... |
| MURFV888 | ATFEKTDSSG | FPDMPVHSSS | KLSTTAFGKK | AYSIVGSHVP | LNASEENSDS |
| CANFV888 | AATEKTQSLG | PPNMSVHFNS | HLGTIVFGNN | SSHIIQSGVP | LELSEEDNDS |
| | 951 | | | | 1000 |
| HUMFV888 | KLLESGLMNS | QESSWGKNVS | STESGRIFPK | KRAHGPALLT | KDNALFKVSI |
| PIGFV888 | | HESSLGENVS | PVESDGIPEK | ERAHGPASLT | KDDVLFKVINI |
| MURFV888 | NILDSTLMYS | QESLPRDNIL | SIENDRLLE | KRFHGIALLT | KDNTLFKDNV |
| CANFV888 | KLLEAPLMNI | QESSLRENVL | SMESNRLFKE | ERIRGPASLI | KDNALFKVINI |

Fig. 2b

| | | |
|----------|--|------|
| | 1001 | 1050 |
| HUMFVIII | <u>SLKTKNKTSN NSATNRKTHI DGPSLLIENS PSVWONI,LE SDTEFKKVTP</u> | |
| PIGFVIII | <u>SLVKTNKARV YLKTNRKIHI DDAALLTENR ASA.....</u> | |
| MURFVIII | <u>SIMKTNKTYN HSTTNEKLHT ESPT.SIENS TTDLQDAILK VNSEIQEVTA</u> | |
| CANFVIII | <u>SSVKTNRAPV NLTHRKRTRV AIPTLLIENS TSVWODIMLE RNTTEFKEVTS</u> | |
| | 1051 | 1100 |
| HUMFVIII | <u>LIHQRMLMDK NATALRLNHM SNKTTSSKNM EMVQQRKEGP IEPDAQNPDM</u> | |
| PIGFVIII | <u>.....TFMDK NTTASGLNHV SN.....</u> | |
| MURFVIII | <u>LIHDGTLLEK NSTYLRLNHM LNRTTSTKNK DIFHRKDEDP IQDEENTIM</u> | |
| CANFVIII | <u>LIHNETFMDR NTTALGLNHV SNKTTLSKNV EMAHQKKEDE VPLRAENPDL</u> | |
| | 1101 | 1150 |
| HUMFVIII | <u>SFFKMLFLPE SARWIQTHG KNSLNSGQGP SPKQVLVSLGE EKSVEGQNF</u> | |
| PIGFVIII | <u>.....WIKGFLG KNPLSSSERGP SPELLTSSGS GKSVKQGSSG</u> | |
| MURFVIII | <u>PFKMLFLSE SSNWFKKTNG NNSLNSEQEH SPKQVYLME KKYVKNQSF</u> | |
| CANFVIII | <u>SSSKIPFLPD WI....KTHG KNSLSSEORF SPKQLTSLGS EKSVRQDNFL</u> | |
| | 1151 | 1200 |
| HUMFVIII | <u>SEKNKVVVGK GEFTKDVGLK EMVFPSSRNL FLTNLNLHE NNTHNQEKKI</u> | |
| PIGFVIII | <u>QGRIRVAVEE EELSKG...K EMMLNSELT FLTNSADVOG NDTHSQGKKS</u> | |
| MURFVIII | <u>SEKNKVTVEQ DGFTKNIGLK DMAFPHNMSI FLTTLSNVHE NGRHNQEKNI</u> | |
| CANFVIII | <u>SE.EKVVVGE DEFTKDELO E.IFPNNKSI FFANLANVOE NDTYNQEKKS</u> | |
| | 1201 | 1250 |
| HUMFVIII | <u>QEEIEKKETL IQENVVLPQI HTVTGTKNFM KNLFLLSTRQ NVEGSYDGY</u> | |
| PIGFVIII | <u>REEMERREKL VQEKVDLPQV YTATGTKNFL RNIFHQSTEP SVEGFDGGSH</u> | |
| MURFVIII | <u>QEEIE.KEAL IEEKVVLPOV HEATGSKNFL KDILILGTRQ NISLYE..VH</u> | |
| CANFVIII | <u>PBEIERKERL TQENVALPQA HTMIGTKNFL KNLFLLSTKQ NVAGLEEOPY</u> | |
| | 1251 | 1300 |
| HUMFVIII | <u>APVLQDPRSL NDSTNRKTHI TAHFSKKG.. EENLEGLGN QTKQIVEKYA</u> | |
| PIGFVIII | <u>APVFQDSRSL NDSAERAETH IAHFSAIR.. EEAPLEAPGN RT.....</u> | |
| MURFVIII | <u>VPVLQNTISI NNSTNTVQIH MEHFFKRRKD KETNSEGLVN KTRMVKNY.</u> | |
| CANFVIII | <u>TPILQDTRSL NDSPHSEGIH MANFSKIR.. EENLEGLGN QTNQMVFRFP</u> | |
| | 1301 | 1350 |
| HUMFVIII | <u>CTTRISPNTS QONFVQORSK RALKQFRLPL EETELEKRII VDDTSTQWSK</u> | |
| PIGFVIII | <u>.....GPG PRSAVPRVK QSLKQIRLPL EEIKPERGVV LNATSTRWS.</u> | |
| MURFVIII | <u>.....PS QKNITQORSK RALQFRL.. ..STQWLK</u> | |
| CANFVIII | <u>STRMSSNAS QH.VITORGK RSLKQFRLSQ GEIKFERKVI ANDTSTQWSK</u> | |
| | 1351 | 1400 |
| HUMFVIII | <u>NNKHLTPSTL TQIDYNEKEK GAITQSPLSD CLTRSHSIFQ ANRSPLEPIAK</u> | |
| PIGFVIII | <u>.....</u> | |
| MURFVIII | <u>TINCSTQCII KQIDHSKEMK KFITKSSLSL SSVIK.SPTQ TNSSDSHIVK</u> | |
| CANFVIII | <u>NMNYLAQGTI TQIEYNEKEK RAITQSPLSD CSMRNHVITQ MNDSALPVAK</u> | |
| | 1401 | 1450 |
| HUMFVIII | <u>VSSFPSIRPI YLTRVLFQDN SSHLEAAS.. .YRKKDSGV QESSHFLOQA</u> | |
| PIGFVIII | <u>.....ESSPILOQA</u> | |
| MURFVIII | <u>TSAFP...PI DLKRSPFQNK FSHVQASSYI YDEKTKSSRI QESNNELKET</u> | |
| CANFVIII | <u>ESASPSVRHT DLTKIPSOHN SSHLPASACN YTFERERTSGV QEGSHFLOEA</u> | |
| | 1451 | 1500 |
| HUMFVIII | <u>KRNNLSLAIL TLEMIGDQNE VGS LGTSATN SVTYKKVENT VLPKPDLEKT</u> | |
| PIGFVIII | <u>KRNNLSLPFL TLEMAGGQK ISALGKSAAG PLASGKLEKA VLSSAGLSEA</u> | |
| MURFVIII | <u>KINNPSSLAIL PWNMFIDQK FTSPGKSNTN SVTYKKRENI IFLKPTLPEE</u> | |
| CANFVIII | <u>KRNNLSLAFV TLGITEGQK FSSLGKSATN QPMYKKLENT VLLQPLSET</u> | |
| | 1501 | 1550 |

Fig. 2c

| | | |
|----------|---|------|
| HUMFVIII | SGKVELLPKV HIYQKDLFPT ETSHGSPGHL DLVEGSLLOQ TEGAIKWNEA | |
| PIGFVIII | SGKAEFLPKV RVHREDLLFO KTSHVSCAHG DLGQEIFLOK TRGPFVNIHKV | |
| MURFVIII | SGKIELLPOV SIOEEELLET ETSHGSPGHL NLMKEVFLOK IOGPTKWNKA | |
| CANFVIII | SDKVELLQOV HVLDQEDSFFT KTSHDSPGHL DLMGKIFLOK TOGPFVMMKT | |
| | 1551 | 1600 |
| HUMFVIII | NRPGKVPFLR VATESSAKTP SKLLDPLAWD NHYGTQIPKE EWKSQEKSPK | |
| PIGFVIII | NRFG.....RTP SKLLGPPM..PK EWESLEKSPK | |
| MURFVIII | KRHGES..IK GKTESKHTR SKLINHHAWD YHYAAQIPKD MWKSKEKSPK | |
| CANFVIII | NSPGKVPFLR WATESEKIP SKLLGVLAWD NHYDTQIPSE EWKSOKKSOT | |
| | 1601 | 1650 |
| HUMFVIII | KTAFKKKDTI .LSLNACESN HAIAAINEGO NKPEIEVWA KOGRTERLC | |
| PIGFVIII | STALRTKDII SLPIDRHESN HSIAAKNEGO AETOREAWT KOGGPRGIC | |
| MURFVIII | IISIKQEDTI .LSLRPHGNS HSIGA.NEQ HWPQRETTV KOGGTQRTIC | |
| CANFVIII | NTAFRRKDTI .LPLGPCENN DSTAINEGO DKPQREAWA KOGGPRGIC | |
| | 1651 | 1700 |
| HUMFVIII | QNEPVEKHHO REITRTLOQ EQEEIDYDOT ISVENKKEDE DIYDEDENOQ | |
| PIGFVIII | EKPEVEKHHO RDISLPTPOP ERDKMDYDDI FSTETKGEDE DIYGEDENQD | |
| MURFVIII | QLEPVEKHHO RELS..AFOS EQEATDYDDA ITIETI.EDF DIYSEDIKQG | |
| CANFVIII | QNEPVEKHHO REITVTTLOP EEDKFEYDDT FSIEMKREDE DIYGBYENQG | |
| | 1701 | 1750 |
| HUMFVIII | PRSFQKTRH YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFPQ | |
| PIGFVIII | PRSFQKTRH YFIAAVEQLW DYGMSES PRA LRNRAQNGEV PRFKKVVPRE | |
| MURFVIII | PRSFQKTRH YFIAAVERLW DYGMST.SHV LRNRYQSDNV PQFKKVVFPQ | |
| CANFVIII | LRSFQKTRH YFIAAVERLW DYGMRSRPHI LRNRAQSGOV QQFKKVVFPQ | |
| | 1751 | 1800 |
| HUMFVIII | FTDGSFTQPL YRGELNEHLG LLGFIYRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYQ | |
| PIGFVIII | FADGSFTQPS YRGELNKHLG LLGFIYRAEV EDNIMVTFKN QASRPYSFYQ | |
| MURFVIII | FIDGSFSQPL YRGELNEHLG LLGFIYRAEV EDNIMVTFKN QASRPYSFYQ | |
| CANFVIII | FTDGSFTQPL YRGELNEHLG LLGFIYRAEV EDNIVVTFKN QASRPYSFYQ | |
| | 1801 | 1850 |
| HUMFVIII | SLISYEEDQR QGAEPKNEV KPNETKTYFW KVQHMMAPTE DEFDCWAY | |
| PIGFVIII | SLISYPDDQE QGAEPRIHEV QPNETRTYFW KVQHMMAPTE DEFDCWAY | |
| MURFVIII | SLISYKEDQ. RGEPRRNEV KPNETKIYFW KVQHMMAPTE DEFDCWAY | |
| CANFVIII | SLISYDEDEG QGAEPKRFV KPNETKIYFW KVQHMMAPTE DEFDCWAY | |
| | 1851 | 1900 |
| HUMFVIII | FSDVDLEKDV HSGLIGPLLV CHTHTLNPAH GRQVTVQEFA LFTTIFDETK | |
| PIGFVIII | FSDVDLEKDV HSGLIGPLLI CRAHTLNAAH GRQVTVQEFA LFTTIFDETK | |
| MURFVIII | FSDVDLEREM HSGLIGPLLI CHAHTLNPAH GRQVSVQEFA LFTTIFDETK | |
| CANFVIII | FSDVDLEKDV HSGLIGPLLI CRSHTLNPAH GRQVTVQEFA LVFTTIFDETK | |
| | 1901 | 1950 |
| HUMFVIII | SWYFTENMER NCRAPCNQM EDPTFKENYR FHAINGYMD TLPGLVMAQD | |
| PIGFVIII | SWYFTENVER NCRAPCHLQM EDPFLKENYR FHAINGYMD TLPGLVMAQN | |
| MURFVIII | SWYFTENVKR NCKTFCNEQM EDPFLKENYR FHAINGYMD TLPGLVMAQD | |
| CANFVIII | SWYFTENLER NCRAPCNVQM EDPFLKENYR FHAINGYMD TLPGLVMAQD | |
| | 1951 | 2000 |
| HUMFVIII | QRIRWYLLSM GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETVE | |
| PIGFVIII | QRIRWYLLSM GSNENIHSIH FSGHVFSVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETVE | |
| MURFVIII | QRIRWYLLSM GSNENIQSIH FSGHVFTVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETLE | |
| CANFVIII | QKRVWYLLSM GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETVE | |
| | 2001 | 2050 |
| HUMFVIII | MLPSKAGIWR VECLIGENLH AGNSTLFLVY SNKCQTPLOM ASGHIRDFOI | |

Fig. 2d

| | | | | | |
|----------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|
| PIGFVIII | MLFSKVGIWR | IECLIGEHLQ | AGMSTTFLVY | SKECQAPLGM | ASGRIRDFQI |
| MURFVIII | MIPSRAGIWR | VECLIGEHLQ | AGMSTLFLVY | SKQCQIPLGM | ASGSIRDFQI |
| CANFVIII | MLPSQVGIWR | IECLIGEHLQ | AGMSTLFLVY | SKKCQTPLGM | ASGHIRDFQI |
| | 2051 | | | | 2100 |
| HUMFVIII | TASGOYGQWA | PKLARLHYSG | SINAWSTKEP | F'SWIKVDLLA | PMI IHG IKTQ |
| PIGFVIII | TASGOYGQWA | PKLARLHYSG | SINAWSTKDF | HSWIKVDLLA | PMI IHG IKTQ |
| MURFVIII | TASGHYQQWA | PNLARLHYSG | SINAWSTKEP | F'SWIKVDLLA | PMI VHGIKTQ |
| CANFVIII | TASGOYGQWA | PKLARLHYSG | SINAWSTKDF | F'SWIKVDLLA | PMI IHG IKTQ |
| | 2101 | | | | 2150 |
| HUMFVIII | GARQKFSSLY | ISQPIIMYSL | DGKKWQTYRG | NSTGTLMVFF | GNVDSSGIKH |
| PIGFVIII | GARQKFSSLY | ISQPIIMYSL | DGRHWQSYRG | NSTGTLMVFF | GNVDASGIKH |
| MURFVIII | GARQKFSSLY | ISQPIIMYSL | DGKKWLSYQG | NSTGTLMVFF | GNVDSSGIKH |
| CANFVIII | GARQKFSSLY | VSQPIIMYSL | DGNKWHSYRG | NSTGTLMVFF | GNVDSSGIKH |
| | 2151 | | | | 2200 |
| HUMFVIII | NIFNPPIIAR | YIRLHPHYS | IRSTLRMELM | GCDLNCSMP | LGMEKKAISD |
| PIGFVIII | NIFNPPIVAR | YIRLHPHYS | IRSTLRMELM | GCDLNCSMP | LGMQNKAISD |
| MURFVIII | NSFNPPIIAR | YIRLHPHSS | IRSTLRMELM | GCDLNCSIP | LGMEKKAISD |
| CANFVIII | NIFNPPIIAQ | YIRLHPHYS | IRSTLRMELL | GCDFNCSMP | LGMEKKAISD |
| | 2201 | | | | 2250 |
| HUMFVIII | AQITASSYFT | NMFATWSPSK | ARLHLQGRSN | AWRFQVNNPK | EWLQVDFQKT |
| PIGFVIII | SQITASSHLS | NIFATWSPSQ | ARLHLQGRTH | AWRPRVSSAE | EWLQVDLQKT |
| MURFVIII | TQITASSYFT | NMFATWSPSQ | ARLHLQGRTH | AWRFQVNDPK | QWLQVDLQKT |
| CANFVIII | AQITASSYLS | SMLATWSPSQ | ARLHLQGRTH | AWRPQANNPK | EWLQVDFRKT |
| | 2251 | | | | 2300 |
| HUMFVIII | MKVTGVTTQG | VKSLLTSMYV | KEFLISSQD | GHQWTLFFQN | GKVKVFQGNQ |
| PIGFVIII | VKVTGITTTQG | VKSLLSMYV | KEFLVSSQD | GRRWTLFLQD | GHTKVFQGNQ |
| MURFVIII | MKVTGIITQG | VKSLFTSMFV | KEFLISSQD | GHHWTQILYN | GKVKVFQGNQ |
| CANFVIII | MKVTGITTTQG | VKSLLSMYV | KEFLISSQD | GHNWTLFLQN | GKVKVFQGNR |
| | 2301 | | | | 2345 |
| HUMFVIII | DSSTPVVNSL | DPPLLTRYLR | IHPQSWVHQI | ALRMEVLGCE | AQDLY |
| PIGFVIII | DSSTPVVNAL | DPPLFTRYLR | IHPQSWAQHI | ALRLEVLGCE | AQDLY |
| MURFVIII | DSSTPMMNSL | DPPLLTRYLR | IHPQIWEHQI | ALRLEILGCE | AQQOY |
| CANFVIII | DSSTPVRNRL | EPPLVARYVR | LHPQSWAHHI | ALRLEVLGCD | TOQPA |

Fig. 2e

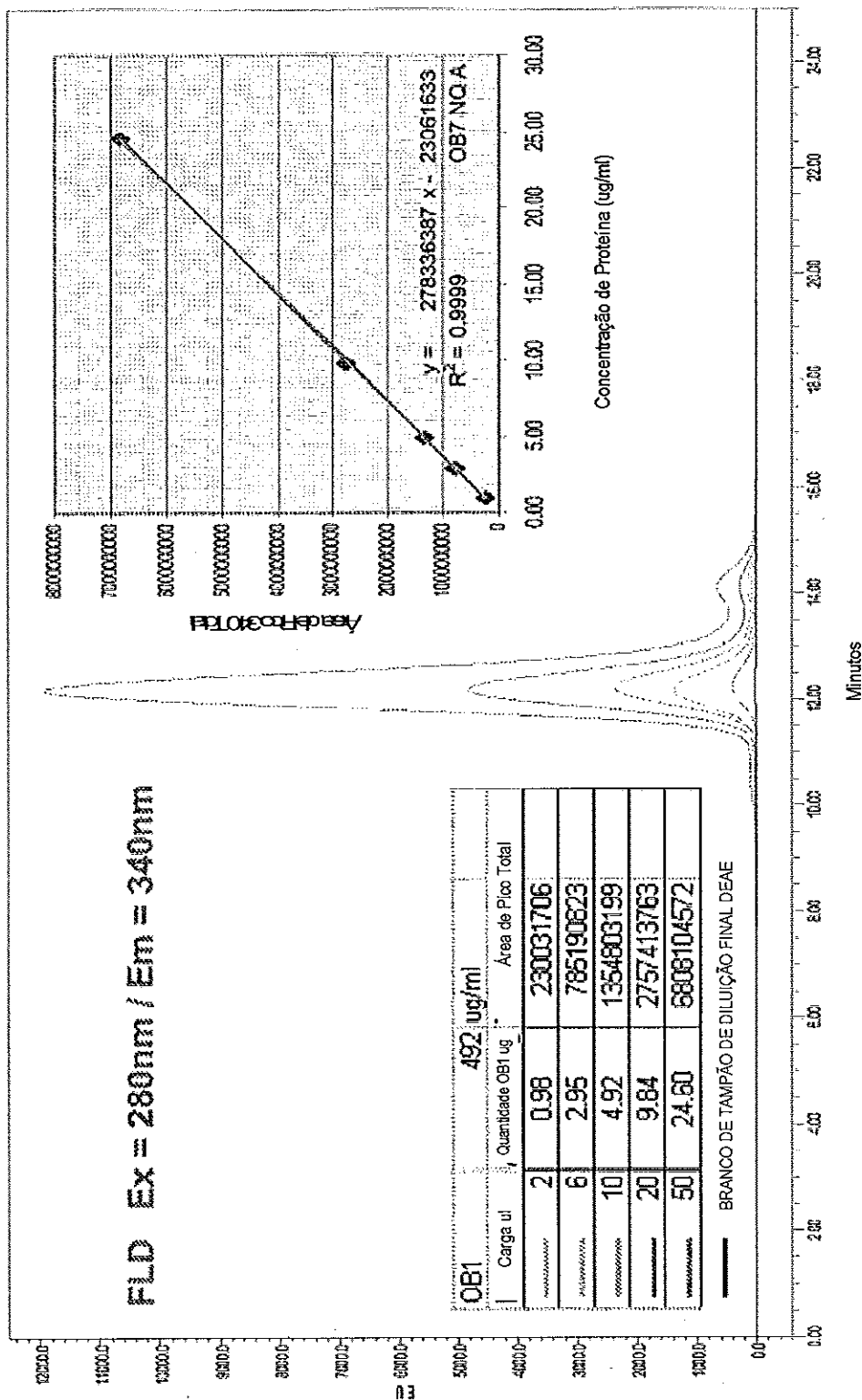


Fig. 3