



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0805767-2 A2**

(22) Data de Depósito: 18/09/2008
(43) Data da Publicação: 24/08/2010
(RPI 2068)



* B R P I 0 8 0 5 7 6 7 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/755
A61K 38/37
A61P 7/04
C12N 15/11

(54) Título: **PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII, USO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA E USO DA MESMA**

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana e a uma composição que a contém. A presente invenção trata ainda do uso da proteína ou composição da invenção para a fabricação de um medicamento para tratar hemofilia A. Adicionalmente, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana. Ainda outro objeto da presente invenção é a proteína recombinante obtida pelo método aqui descrito, e seu uso para preparar um medicamento para o tratamento de hemofilia A.

(73) Titular(es): Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas



**“PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO
SANGUÍNEA HUMANA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA PROTEÍNA
RECOMBINANTE DO FATOR VIII, USO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO
DE OBTENÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE
5 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA E USO DA MESMA”**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante do
fator VIII (FVIII) de coagulação sanguínea humana, a uma composição que a
contém e seus usos para preparar um medicamento para o tratamento de
10 hemofilia A.

Adicionalmente, a presente invenção refere-se ao método de
obtenção de uma proteína recombinante do fator VIII (FVIII) de coagulação
sanguínea humana.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 A hemofilia A é uma doença recessiva ligada ao sexo, causada
pela deficiência do fator VIII de coagulação sanguínea no plasma.

Os pacientes com hemofilia A podem, frequentemente, apresentar
hematomas. Ainda, são comuns hemartroses (sangramento nas articulações)
nos tornozelos, joelhos, quadris e cotovelos. Elas são freqüentemente
20 dolorosas, e episódios repetidos podem levar à destruição da sinóvia e à
diminuição da função articular. Sangramentos intracranianos também são
comuns, podendo levar à morte de hemofílicos.

O fator VIII (FVIII) é um procofator glicoproteína sintetizado e
liberado na corrente sanguínea pelo endotélio vascular. No sangue circulante,
25 ele é principalmente ligado ao fator de von Willebrand (vWF) para formar um
complexo estável. Na cascata da coagulação o fator VIIIa se associa com o
fator IXa (fator VIIIa:fator IXa), o qual converte o fator X em fator Xa. Este
último se associa ao complexo protrombinase (fator Va:fator Xa) o que resulta

na conversão da protrombina em trombina (IIa). A trombina, por sua vez exibe atividades procoagulantes, convertendo o fibrinogênio em fibrina, promovendo ativação plaquetária e ativando o fator XIII da coagulação, que, por sua vez, estabiliza o coágulo de fibrina.

5 Produtos de FVIII derivado de plasma humano foram rotineiramente utilizados na técnica para tratar indivíduos com hemofilia A. Concentrados de FVIII foram desenvolvidos, e o uso destes concentrados aumentou a duração e qualidade de vida das pessoas com hemofilia A. No entanto, estes produtos infectaram os pacientes com vírus da hepatite B (HBV),
10 vírus da hepatite C (HCV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Os inconvenientes relacionados aos concentrados derivados de plasma, purificados ou não, estimularam as tentativas no desenvolvimento de produtos recombinantes de FVIII, para uso em pacientes com hemofilia A.

15 Desta forma, no início dos anos 90, companhias farmacêuticas iniciaram o desenvolvimento de produtos com o fator VIII sintético recombinante (rFVIII).

O gene que codifica a proteína do FVIII situa-se na região 28 do braço longo do cromossomo X (Xq28) e apresenta uma extensão de 186 Kb com uma estrutura bastante complexa (Poustka A, Dietrich A, Langenstein G, Toniolo D, Warren ST and Lehrach H. "Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8302-6). O RNA relativo ao FVIII é composto por 9010 nucleotídeos, possuindo uma pequena região 5' não-traduzida (150 nucleotídeos), a região entre o códon iniciador e o códon de término (7056 nucleotídeos), e uma longa
25 região 3' não-traduzida (Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL and et al. "Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones". *Nature* 1984;312:330-7).

A proteína deduzida da seqüência de nucleotídeos do cDNA do FVIII contém 2351 aminoácidos, onde os primeiros dezenove aminoácidos representam a seqüência peptídica sinal, e os outros 2331 aminoácidos a proteína madura. Esta proteína apresenta três domínios nomeados de A (330 aminoácidos), B (980 aminoácidos) e C (160 aminoácidos) sendo três repetições do domínio A, duas do domínio C e um único domínio B. Esses domínios apresentam a seguinte disposição: A1-A2-B-A3-C1-C2, sendo a cadeia pesada constituída pelos domínios A1-A2-B e a cadeia leve pelos domínios A3-C1-C2.

Como é conhecido por um técnico no assunto, quanto maior a molécula a ser produzida, menor será o rendimento, e mais difícil será a manipulação da mesma.

Desta forma, a complexidade e grande tamanho do fator VIII conduziram os pesquisadores a focarem seus estudos iniciais na investigação das condições (como linhagem celular e vetor) mais apropriadas para a produção do fator VIII biologicamente ativo.

Os primeiros vetores plasmidiais que permitiram a expressão do FVIII recombinante em células de mamíferos apresentavam as características básicas dos vetores de expressão, entre eles, uma região promotora (promotor SV40 ou adenovirus-2) e um sinal de poliadenilação (do gene que codifica o antígeno de superfície do vírus da hepatite). Nesses estudos iniciais, foi realizada a clonagem e expressão do rFVIII completo em linhagens celulares de murinos (COS e 62.2 - linhagem celular derivada de rim de hamster chinês), e os níveis de atividade biológica do fator VIII presente no sobrenadante dessas culturas celulares foram da ordem de 0,01 IU/ml (Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL and et al. "Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones". *Nature* 1984;312:330-7) e (Toole JJ, Knopf JL,

Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC and et al. "Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor". *Nature* 1984;312:342-7).

Em seguida, Pavirani et al. (Pavirani A, Meulien P, Harrer H, Dott K, Mischler F, Wiesel ML, Mazurier C, Cazenave JP e Lecocq JP. "Two independent domains of factor VIII co-expressed using recombinant vaccinia viruses have procoagulant activity". *Biochem Biophys Res Commun* 1987;145:234-40) propuseram duas modificações para a produção do fator VIII: o uso de vetores virais e a co-transfecção da cadeia pesada com a cadeia leve, uma vez que é conhecido na técnica que o domínio B não é necessário para a atividade biológica do fator VIII. Nesse estudo, a análise da atividade biológica do fator VIII completo ou após a co-infecção das cadeias pesadas e leve do fator VIII produzido em células BHK foi da ordem de 0,1 IU/mL ou 0,01 IU/mL, respectivamente.

Posteriormente, foram realizadas construções recombinantes contendo o cDNA relativo ao fator VIII em quatro diferentes vetores virais, entre eles, vetores adenovirais, adeno-associados, retrovirais e lentivirais. Nestes estudos, ensaios funcionais do fator VIII recombinante presentes em diferentes linhagens celulares demonstraram níveis de atividade biológica bastante variável, conforme a linhagem celular e o tipo de vetor. Por exemplo, linhagens celulares transfectadas com vetores adeno-associados mostraram níveis de atividade biológica da ordem de 0,02-0,08 IU/mL (Chao H, Mao L, Bruce AT and Walsh CE. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood* 2000;95:1594-9), enquanto que linhagens transfectadas com vetores adenovirais portadores de rFVIII mostraram níveis de atividade biológica entre 0,25-3,15 IU/mL (Andrews JL, Weaver L, Kaleko M and Connelly S. Efficient adenoviral vector transduction and expression of functional human factor VIII in cultured primary human hepatocytes.

Haemophilia 1999;5:160-8). Ainda, estudos utilizando culturas primárias e vetores retrovirais, mostraram a geração de uma população portadora de rFVIII com níveis de atividade biológica entre 0,3-0,7 IU/mL . (Van Damme A, Chuah MK, Dell'accio F, De Bari C, Luyten F, Collen D and VandenDriessche T. Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats. Haemophilia 2003;9:94-103).

É importante ressaltar que os mencionados vetores utilizados nos estudos realizados no estado da técnica são monocitrônicos, ou seja, permitem a expressão de um único mRNA a partir da região promotora, e não apresentam um gene marcador de seleção. Desta maneira, nesses casos, a expressão e atividade do rFVIII é investigada transitoriamente, entre 24 e 72 horas após a transfecção.

No entanto, há aproximadamente 18 anos, este cenário foi modificado, com a descoberta de que o controle da tradução de alguns RNAs mensageiros poderia ser governada por um mecanismo independente de sua estrutura "cap". Nesse caso, a tradução do RNA mensageiro seria dependente de uma seqüência interna específica do mRNA, reconhecida pelo RNA ribossômico, denominada IRES (sítio de entrada interno do ribossomo). Entre suas distintas aplicações, essa descoberta levou ao desenvolvimento de vetores de DNA plasmidiais bicitrônicos que permitissem a expressão de dois genes distintos: o gene marcador de seleção e o gene de interesse, a partir de uma única região promotora (Gurtu V, Yan G and Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. Biochem Biophys Res Commun 1996;229:295-8).

Com o uso de vetores bicitrônicos, três são as principais estratégias utilizadas para a geração de uma população celular com expressão estável do rFVIII, entre elas: 1) seleção da população transgênica por citometria de fluxo mediante a análise da expressão da proteína GFP (proteína

fluorescente verde – do Inglês Green Fluorescent Protein); 2) tratamento da população transgênica com geneticina mediante a co-expressão do gene que codifica para neomicina e 3) tratamento da população transgênica com metotrexato mediante a co-expressão do gene que codifica para dihidrofolato redutase (DHFR).

No primeiro caso, linhagens de fibroblasto NIH3T3/rFVIII Δ B+/GFP+ modificadas geneticamente com o sistema retroviral e selecionadas com a expressão de GFP mostraram a secreção do rFVIII biologicamente ativo com um nível de $0,93\pm 0,13$ IU/10⁶ células (Moayeri M, Ramezani A, Morgan RA, Hawley TS and Hawley RG. "Sustained phenotypic correction of hemophilia a mice following oncoretroviral-mediated expression of a bioengineered human factor VIII gene in long-term hematopoietic repopulating cells". *Mol Ther* 2004;10:892-902). Estudos adicionais mostraram níveis de atividade biológica entre 1,0-5,0 UI/mL, em linhagens celulares humanas hepáticas quando transduzidas com vetores lentivirais portadores do promotor de citomegalovirus (CMV) (Picanco V, Heinz S, Bott D, Behrmann M, Covas DT, Seifried E and Tonn T. "Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter". *Cytotherapy* 2007;9:785-94).

Outros grupos de pesquisa adotaram o tratamento com geneticina para a seleção de uma população celular com expressão estável do rFVIII. Neste caso, linhagens de células Cos-7 (rim de macaco) ou SMMC-7721 (hepatoma humano) foram transfectadas com rFVIII, utilizando o sistema plasmidial. Após a seleção com geneticina, foi diagnosticada a secreção do rFVIII com uma atividade biológica de $0,24\pm 0,005$ IU/10⁶ células e $0,74\pm 0,003$ IU/10⁶ células, respectivamente (Chen C, Fang XD, Zhu J, Wu XF, Zhang ZC, Gu JX, Wang ZY and Chi CW. "The gene expression of coagulation factor VIII

in mammalian cell lines". *Thromb Res* 1999;95:105-15).

A seleção com metotrexato é outra forma de tratamento amplamente utilizada em virtude de sua eficácia e baixo custo. Neste sentido, linhagens celulares CHO deficientes em dihidrofolato redutase (DHFR) foram
5 transfetadas com plasmídeos bicistrônicos portadores de rFVIII, e o gene da neomicina. Após a transfecção, foi realizada a dupla seleção, inicialmente com geneticina, seguido do tratamento com metotrexato. A análise da atividade biológica pelo ensaio do tempo de ativação parcial da tromboplastina mostrou a
10 geração de um clone celular com produção de rFVIII entre 0,5-2 IU/10⁶ células (Chun BH, Park SY, Chung N and Bang WG. "Enhanced production of recombinant B-domain deleted factor VIII from Chinese hamster ovary cells by propionic and butyric acids". *Biotechnol Lett* 2003;25:315-9).

Desta forma, o advento dos vetores bicistrônicos permitiram a expressão estável do FVIII recombinante em diferentes linhagens celulares de
15 mamíferos, e diferentes estratégias para a seleção de um clone celular portador de altos níveis de rFVIII vêm sendo desenvolvidas no estado da técnica.

O fator recombinante VIII de coagulação sangüínea constitui um medicamento bastante seguro para o tratamento de indivíduos portadores de Hemofilia A. Em alguns países como Canadá e Irlanda, é a única fonte de
20 tratamento para esses pacientes, e vêm sendo utilizado não apenas como terapia, mas também como profilaxia. Em outros países, como os Estados Unidos, 70% dos hemofílicos são tratados com a forma recombinante dessa proteína, enquanto outros 30% dependem do fator VIII purificado a partir do plasma de indivíduos saudáveis.

25 Exemplos de produtos recombinantes utilizados na técnica incluem: KOGENATE e KOGENATE FS da Bayer, RECOMBINATE da Baxter, e REFACTO da Wyeth/Genetics Institut. Nestes casos, a proteína recombinante é produzida em células CHO (ovário de hamster chinês) ou em

BHK (rim de hamster recém nascido), que são transfectadas estavelmente como FVIII completo ou sem o domínio B (Lee CA, Owens D, Bray G, Giangrande P, Collins P, Hay C, Gomperts E, Schroth P and Barrowcliffe T. "Pharmacokinetics of recombinant factor VIII (recombinate) using one-stage clotting and chromogenic factor VIII assay". *Thromb Haemost* 1999;82:1644-7).

A hemofilia A afeta 1 em cada 5.000 nascimentos masculinos em todo o mundo. No Brasil, estima-se a existência de 9000 hemofílicos cadastrados que demandariam, em condições ideais, 630 milhões de UI do fator VIII para o seu adequado tratamento (70.000 UI/paciente/ano).

Como os produtos recombinantes têm sido produzidos em apenas algumas regiões do mundo, e por poucas empresas, isso leva a uma carência no fornecimento do produto.

Adicionalmente, observou-se que o fator VIII recombinante produzido por linhagens não-humanas, pode levar o paciente a desenvolver anticorpos neutralizadores de atividade (inibidores).

Desta forma, o alto custo do fator VIII recombinante, sua limitada quantidade disponível no mercado e a possibilidade de desenvolver anticorpos inibidores, são fatores que têm incentivado os pesquisadores ao desenvolvimento de novas formulações de rFVIII, tornando-o mais acessível a população de hemofílicos A, e mais clinicamente eficazes e viáveis.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A partir de um aprofundado estudo dos mecanismos moleculares que governam a expressão do gene que codifica a proteína do FVIII, bem como a caracterização bioquímica minuciosa da proteína do FVIII, a Depositante conseguiu desenvolver uma nova molécula recombinante do FVIII, produzida em níveis elevados, particularmente em linhagens celulares humanas.

A molécula da presente invenção, além de ser produzida em níveis elevados, apresenta atividade biológica aumentada e não apresenta o

inconveniente de induzir o desenvolvimento de anticorpos inibidores, uma vez que é produzida a partir de linhagem celular humana.

5 Desta forma, a presente invenção refere-se a uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana, que apresenta o domínio B reduzido, em que são preservados de 17 a 19 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde de 6 a 8 aminoácidos preservados são do N-terminal, e de 11 a 13 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original, e que apresenta, entre os aminoácidos conservados do N-terminal e do C-terminal, uma serina e uma treonina.

10 Outro objeto da presente invenção é uma composição que compreende a proteína recombinante do fator VIII da presente invenção.

 A presente invenção refere-se ainda ao uso da proteína recombinante aqui descrita, ou da composição que a contém, para a fabricação de um medicamento para tratar hemofilia A.

15 Um objeto adicional da presente invenção é o método de obtenção de uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana, em que o método compreende:

 a) obtenção de uma molécula de DNA que codifica o fator VIII de coagulação sanguínea humana;

20 b) amplificação da molécula da etapa (a) por PCR, utilizando primers que restringem a seqüência de nucleotídeos que codifica o domínio B, onde o primer 3' restringe para uma seqüência que codifica de 6 a 8 aminoácidos do N-terminal do domínio B original, e o primer 5' restringe para uma seqüência que codifica de 11 a 13 aminoácidos do C-terminal do domínio B original, em que um dos primers apresenta ainda nucleotídeos que codificam serina (S), e o outro primer apresenta nucleotídeos que codificam treonina (T),
25 que são inseridos entre as seqüências de nucleotídeos conservados do N-terminal e do C-terminal do domínio B;

c) introdução da molécula de DNA recombinante de FVIII obtida pela etapa (b) em um vetor;

d) introdução do elemento IRES no vetor da etapa (c), através de enzimas de restrição, após o isolamento por PCR;

5 e) transfecção de células humanas com o vetor obtido pela etapa (d);

f) tratamento da cultura de células humanas com concentrações de drogas quimioterapêuticas e estringência crescentes;

g) cultivo das culturas recuperadas; e

10 h) recuperação do fator VIII recombinante obtido pelas mencionadas culturas.

Adicionalmente, a presente invenção tem por objeto a proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana, obtida pelo método acima, e ao uso desta proteína para a fabricação de um medicamento para o tratamento de hemofilia A.

15 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 representa uma figura esquemática da molécula híbrida da presente invenção (cadeia pesada + cadeia leve + 17 aminoácidos do domínio B + 2 aminoácidos de fusão). A dita molécula é uma molécula única, em que foi realizada a fusão da cadeia pesada (domínios A1 e A2) com a

20 cadeia leve (domínios A3, C1 e C2). Na união das duas cadeias foram conservados 17 aminoácidos do domínio B, acrescidos de 2 aminoácidos extras, entre os ditos 17 aminoácidos.

A figura 2 representa a análise do seqüenciamento da região IRES presente no vetor da presente invenção. A seqüência em negrito foi inserida em

25 todos os clones devido ao primer utilizado. As bases grifadas demonstram a base adenina que foi acrescentada, e a inversão de GC para CG.

A figura 3 ilustra a estratégia para a produção do FVIII recombinante da presente invenção na linhagem celular HepG2.

A figura 4 ilustra a análise da atividade biológica do FVIII recombinante da presente invenção em 10 clones celulares de HepG2 contendo a mencionada molécula da invenção. O clone 18 mostrou níveis mais elevados de FVIII da ordem de 29 IU/mL conforme avaliado pelo teste de
5 ativação parcial de protrombina

A figura 5 ilustra a expressão permanente do mRNA relativo ao fator VIII da invenção na linhagem celular HepG2, através de gel de agarose corado por brometo de etídeo após a eletroforese dos produtos de RT-PCR. Cerca de 2 µg de RNA total foram submetidos a reação com a transcriptase
10 reversa, utilizando primers específicos do FVIII (3B), e β-actina (1A e 3A). Em seguida, 1/10 do produto da reação de RT é submetida a reação de PCR utilizando primers específicos do FVIII (raias 1 e 3 -B), e β-actina (raias 1 e 3 -
A). As raias 1 e 2 apresentam o RNA das células HepG2 não transduzidas, mostrando em 1 uma banda de 612 pb referente ao gene da β-actina, e nos
15 demais controles de ausência de amplificação. As raias 3 e 4 apresentam o RNA das células HepG2 transduzidas com FVIII da invenção, mostrando os fragmentos de 612pb e 546pb, relativos ao gene da β-actina e FVIII, respectivamente. As demais raias (2 e 4) representam o controle negativo da
reação de RT, em que não foi adicionado a transcriptase reversa. As primeiras
20 raias mostram o DNA marcador de peso molecular φX 174 (fragmentos 1353; 1078; 872; 603 e 310 pb).

A figura 6 ilustra a expressão de FVIII da presente invenção na linhagem celular HepG2, após o tratamento com as drogas quimioterapêuticas O⁶-Benzilguanina + Temozolomide. (A) gráfico "dot plot" SSCXFSC, mostrando
25 o tamanho e complexidade celular de HepG2 virgens; (B) gráfico tipo histograma, mostrando a ausência da expressão de FVIII nas células HepG2 virgens; e (C) gráfico tipo histograma, mostrando o nível de expressão de FVIII através da ligação específica com anticorpo anti- na população celular HepG2.

A figura 7 ilustra a análise da expressão da proteína do FVIII da presente invenção no sobrenadante das células recombinantes HepG2, e ausência do mesmo nas células virgens. À esquerda, foi utilizado o anticorpo anti-cadeia pesada e, à direita, o anticorpo anti-cadeia leve. A e C representam eletroforese em Phast System com gel SDS/PAGE 12,5%, corado com Comassie blue R250 0,25%. A raia pdF8 representa o concentrado liofilizado do FVIII humano comercial, a raia 1 representa o sobrenadante da célula HepG2 virgem, e a raia 2 representa o sobrenadante da célula recombinante HepG2 com o FVIII da invenção. B e D representam imunodeteção da proteína transferida para membrana de PVDF por "Western blotting". Observa-se uma banda imunoreativa do tamanho esperado de 90 kDa na membrana incubada com o anticorpo anti-cadeia pesada do FVIII, e uma banda imunoreativa do tamanho esperado de 80 kDa na membrana incubada com o anticorpo anti-cadeia leve do FVIII. A raia à esquerda mostra o marcador de peso molecular (bandas 97, 66, 45 e 30 kDa).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em uma primeira realização, a presente invenção refere-se a uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana, que compreende o domínio B reduzido, em que são preservados de 17 a 19 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde de 6 a 8 aminoácidos preservados são do N-terminal, e de 11 a 13 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original, e que apresenta, entre os aminoácidos conservados do N-terminal e do C-terminal, uma serina e uma treonina, sendo que a proteína recombinante é preferencialmente produzida por linhagens humanas.

Dentro de uma realização particular, as linhagens celulares humanas são selecionadas entre linhagens hepáticas. De preferência, a linhagem humana utilizada pela presente invenção para a obtenção de uma proteína recombinante do

fator VIII de coagulação sanguínea humana é HepG2.

A proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana da presente invenção é produzida em níveis elevados, uma vez que possui uma estrutura menor do que o FVIII natural, e apresenta atividade biológica aumentada, sendo apropriada para uso no tratamento de hemofilia A.

A presente invenção trata ainda de uma composição que compreende a proteína recombinante do fator VIII da presente invenção e veículos, excipientes ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis.

A composição de acordo com a presente invenção pode ser líquida, semi-sólida ou sólida, e pode ser adaptada para qualquer rota de administração enteral ou parenteral, seja de liberação imediata ou modificada. Em uma realização particular, dita composição é adaptada para administração oral, mais particularmente, na forma de comprimidos, cápsulas, tinturas, emulsões, lipossomas, microcápsulas ou nanoparticulas.

Veículos, excipientes ou estabilizantes adequados à invenção são, por exemplo, e sem qualquer limitação, aqueles citados na obra *Remington's Pharmaceutical Sciences*, da editora americana Mack Publishing, ou ainda na Farmacopéia Européia ou Farmacopéia Brasileira.

Em outro aspecto, a presente invenção trata do uso da proteína FVIII recombinante da invenção, ou de composições que a contêm, para a preparação de medicamentos para tratar hemofilia A.

Em outra realização, a presente invenção refere-se a um método de obtenção de uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana, em que o método compreende:

a) obtenção de uma molécula de DNA que codifica o fator VIII de coagulação sanguínea humana;

b) amplificação da molécula da etapa (a) por PCR, utilizando primers que restringem a seqüência de nucleotídeos que codifica o domínio B,

onde o primer 3' restringe para uma seqüência que codifica de 6 a 8 aminoácidos preservados são do N-terminal, e de 11 a 13 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original, em que um dos primers apresenta ainda nucleotídeos que codificam serina (S), e o outro primer apresenta nucleotídeos que codificam treonina (T), que são inseridos entre as seqüências de nucleotídeos conservados do N-terminal e do C-terminal do domínio B;

c) introdução da molécula de DNA recombinante de FVIII obtida pela etapa (b) em um vetor;

d) introdução do elemento IRES no vetor da etapa (c), através de enzimas de restrição;

e) transfecção de células humanas com o vetor obtido pela etapa (d);

f) tratamento da cultura de células humanas com concentrações de drogas quimioterapêuticas e estringência crescentes;

g) cultivo das culturas recuperadas; e

h) recuperação do fator VIII recombinante obtido pelas mencionadas culturas.

De acordo com uma realização preferencial, os primers utilizados na etapa (b) apresentam a seguinte seqüência (sendo 1 e 2 para a região N-terminal e 3 e 4 para a região C-terminal):

Primer 1 – 5'-TTCTATCACACGTGACCATGCAAATAGAGCTCTCCACC-3'

Primer 2 – 5'-TTCTATAAAGTACTTGAATTCTGGGAGAAGCTTCTTG-3'

Primer 3 – 5'-TTCTATAAAGTACTCAAACCCACCAGTCTTGAAAC-3'

Primer 4 – 5'-TTCTATACACACGTGTCAGTAGAGGTCCTGTGCC TC-3'

As condições utilizadas para reação de PCR, são conhecidas pelos técnicos no assunto e descritas no estado da técnica.

A etapa (c) é realizada particularmente a partir da digestão da molécula da etapa (b) com uma endonucleases específica, preferencialmente

Pme I, e ligação da molécula assim tratada ao DNA do vetor linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

Ainda, a etapa (d) do método acima é realizada a partir da digestão do vetor da etapa (c) com endonucleases específicas, preferencialmente *Pme I* e *Nco I*, e ligação do vetor assim tratado ao IRES linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

Em uma realização preferencial, o vetor utilizado pela presente invenção é um vetor retroviral, particularmente, plasmidial retroviral. De acordo com uma realização preferencial, o vetor utilizado é pMGF-P140K.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, a transfecção das células humanas com o vetor obtido pela etapa (d) pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica. Particularmente, a transfecção é realizada através de lipofectamina.

Particularmente, o método da presente invenção apresenta um sistema de produção de retrovírus. Primeiramente, o FVIII é transfectado em células produtoras de retrovírus anfotrópicas. Em seguida, a célula humana é então transduzida com o retrovírus produzido pela linhagem anfotrópica.

Ainda, as drogas quimioterapêuticas utilizadas pela presente invenção para o tratamento das culturas transfectadas pode ser qualquer uma apropriada no estado da técnica, desde que o vetor utilizado contenha um gene de resistência para o mesmo. De forma particular, as drogas quimioterapêuticas utilizadas são O⁶-Benzilguanina e Temozolomide, sem excluir qualquer outro sistema de seleção adequado.

Conforme descrito acima, a seleção das culturas transduzidas é realizada a partir de tratamento crescente com drogas quimioterapêuticas, com estringência também crescente. De acordo com a presente invenção, as doses de drogas quimioterapêuticas utilizadas na primeira seleção (baixa

estringência) estão compreendidas entre 200 e 400 µg/mL, e as doses de drogas quimioterapêuticas utilizadas na segunda seleção (alta estringência) estão compreendidas entre 500 e 800 µg/mL.

5 O cultivo das células é realizado sob condição padrão, podendo ser determinado pelo técnico no assunto dependendo do tipo de linhagem celular utilizada. Particularmente, o cultivo é realizado a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

10 Ainda, a recuperação do fator VIII recombinante obtido pelo método da presente invenção pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica.

O método da presente invenção permite obter proteínas FVIII recombinantes humanas em altos níveis, sendo que as proteínas apresentam alta atividade biológica e não apresentam os inconvenientes apresentados pelas proteínas recombinantes da técnica.

15 De acordo com uma realização adicional, a presente invenção refere-se à proteína recombinante do fator VIII obtida pelo método descrito acima, apresentando o domínio B reduzido, em que são preservados de 17 a 19 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde de 6 a 8 aminoácidos preservados são do N-terminal, e de 11 a 13 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original, e que apresenta, 20 entre os aminoácidos conservados do N-terminal e do C-terminal, uma serina e uma treonina.

Ainda outro objeto da presente invenção refere-se ao uso da proteína obtida pelo método da presente invenção na preparação de um medicamento para tratar hemofilia A. 25

A presente invenção pode ser compreendida de forma mais clara e precisa através da leitura dos exemplos a seguir, que ilustram a presente invenção sem apresentar qualquer caráter limitativo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

PRODUÇÃO DE FVIII MUTANTE A PARTIR DE LINHAGENS HUMANAS

A linhagem celular humana HepG2 foi transduzida com o vetor retroviral *FVIII Δ B_{ST}P140K*, que contém o FVIII recombinante da presente invenção e o elemento IRES ilustrado pela figura 2. Após o tratamento com concentrações crescentes das drogas quimioterapêuticas O⁶-Benzilguanina + Temozolomide para a seleção de uma população celular com altos níveis de expressão de rFVIII, foi realizada a clonagem celular. A figura 3 mostra a estratégia utilizada para a geração da linhagem celular humana com expressão estável do fator VIII de coagulação sangüínea humana, e elevados níveis do mesmo.

A análise da atividade biológica do FVIII presente no sobrenadante destes clones celulares mostrou a variação na atividade biológica entre 4,8 e 29 vezes superior ao fator VIII presente no plasma sangüíneo e ao fator VIII recombinante produzido pelas linhagens murinas descritas no estado da técnica (figura 4).

EXEMPLO 2

AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE PRODUÇÃO DA MOLÉCULA RECOMBINANTE DA INVENÇÃO

PELA LINHAGEM CELULAR HUMANAS HEPG2

A avaliação do nível de produção da molécula recombinante *FVIII Δ B_{ST}P140K* pela linhagem celular humana HepG2 pode ser realizada por RT-PCR convencional; citometria de fluxo, tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e *western blot*.

RT-PCR CONVENCIONAL

A avaliação por RT-PCR convencional, ilustrada pela figura 5, permitiu diagnosticar a presença do mRNA relativo ao fator VIII de coagulação da presente invenção utilizando o seguinte procedimento: é realizada a extração de RNA total utilizando o kit *RNAasy Mini kit* (Quiagen), de acordo com

as instruções do fabricante. Em seguida, 1 a 3 µg de RNA total é convertido em cDNA, utilizando o kit *Superscript II (Invitrogen)*, conforme as instruções do fabricante, e 50 pmoles de primer randômico. Posteriormente, o fragmento de DNA relativo ao fator VIII da invenção é amplificado em uma mistura reacional que contém: 2 µL do cDNA, 0,2 M de dNTPs; 1 U da enzima Taq DNA polimerase (*Amershan Bioscience*), 2,5 µL do tampão 10x da respectiva enzima (*Amershan Bioscience*) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo P5FVIII5seq e P3FVIIIseq. Essa reação foi realizada em termociclador com o programa: 95°C por 2min; 35 ciclos de 95°C por 40s, 56°C por 40s e 72°C por 1min; 72°C por 10min.

CITOMETRIA DE FLUXO

Para marcação intracelular da proteína do FVIII recombinante da presente invenção, cerca de 1×10^6 de células HepG2/FVIII Δ B_{ST}P140K são fixadas com paraformaldeído 1% (m/v) durante 20 minutos a 4°C e, em seguida, permeabilizadas com Tween 0,5% por 15 minutos a 37°C. Após a etapa de lavagem com PBS-BSA 2%, as células são incubadas com solução de bloqueio (soro de cabra 10%) por 1 hora a 37°C. A seguir, é colocado o anticorpo primário monoclonal (QED) diluído em solução PBS-BSA 2% (1:100), por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, é realizada a lavagem com PBS-BSA 2%, e as células são incubadas com o anticorpo secundário diluído em solução PBS-BSA 2% (1:400), durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após este período, é realizada uma segunda lavagem com PBS 1X; e as células são eluídas em 100µL de PBS 1X, para posterior análise de emissão de fluorescência pelas células recombinantes por de citometria de fluxo. A quantificação da emissão de fluorescência foi realizada com uma suspensão celular utilizando 10.000 eventos (células) em citômetro de fluxo laminar (*FACSort, Beckton Dickinson, San Jose, CA, EUA*).

A avaliação por citometria de fluxo mostrou que a população celular recombinante HepG2 apresenta uma expressão estável do FVIII da ordem de 77%, conforme ilustrado pela figura 6.

ENSAIO DE TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO (TTPA)

5 A avaliação da atividade biológica é realizada pelo teste do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) ilustrado pela tabela 1.

TABELA 1

Clones HepG2-FVIIIΔB_{ST}P140K	Atividade Biológica (IU/mL)
1	10,0
2	10,0
3	8,7
4	8,8
8	4,8
9	25,0
12	15,0
14	11,0
17	18,0
18	29,0

O teste da coagulação TTPA (tempo de tromboplastina parcial ativado), mede a velocidade *in vitro* que uma amostra de plasma contendo o FVIII leva para coagular uma amostra de plasma deficiente em FVIII. O parâmetro medido é o tempo necessário para a atividade protrombínica, sendo assim, o tempo levado para coagulação varia de acordo com a concentração de FVIII presente na amostra a ser analisada. Na presente invenção, a amostra a ser testada foi diluída 1:10 em tampão (Owren's Veronal - Biomérieux) e, depois de 20 segundos, misturada com o plasma deficiente em FVIII humano (Biomérieux, Durham), fosfolípidos e um ativador de contato (Platelin® LS - Biomérieux). Depois da incubação por aproximadamente 240 segundos a 37°C, 100 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,25M) foi adicionado, e o tempo para a formação do coágulo foi marcado, utilizando o coagulômetro automático

(COAG-A-MATE® XM - Organon Teknika), de acordo com as instruções do fabricante. Antes de iniciar a dosagem, uma curva de calibração padrão foi construída, utilizando FVIII derivado do plasma (*Verify – Reference plasma – Organon Teknika, Durham*), reconstituído com 1mL de água destilada e diluído para concentração de (1 U mL FVIII). Seis diluições (1:5; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160) são realizadas em tampão (*Owren`s Veronal - Biomerieux*), e usadas para construção da curva para cada amostra. Uma relação linear foi traçada em um gráfico, com atividade de FVIII em escala logarítmica (abscissa) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (segundos), e a porcentagem de atividade de FVIII calculada foi obtida com a média da inclinação da curva.

A tabela 1 mostra a análise da atividade biológica do FVIII presente no sobrenadante de 10 clones celulares da população celular HepG2/*FVIII Δ B_{ST}P140K* através do teste TTPA. Pode-se observar que os clones celulares recombinantes portadores do FVIII após o tratamento com O⁶-Benzilguanina + Temozolomide, apresentam níveis de atividade biológica de FVIII da ordem de 4,8 a 29 vezes ao nível de fator VIII presente no plasma sanguíneo.

WESTERN BLOT

A caracterização da proteína *FVIII Δ B_{ST}P140K*, produzida pela linhagem celular HepG2/*FVIII Δ B_{ST}P140K*, foi realizada por *western blot*.

Para o preparo do gel, 7 mL de sobrenadante são coletados de 1×10^7 células HepG2/*FVIII Δ B_{ST}P140K* e submetidos a concentração em colunas *Centricon® Amicon® (Millipore)*, por centrifugação à 7500 rpm durante 2 a 4 horas. Em seguida, é realizada uma lavagem utilizando 3 ml de H₂O *MilliQ* autoclavada, por centrifugação à 6000 rpm. Posteriormente, as colunas foram invertidas para eluição das amostras em aproximadamente 150 μ l de H₂O *MilliQ* autoclavada, e centrifugadas à 6000 rpm durante 15 minutos. Após a eluição da proteína, as amostras são quantificadas em um espectrofotômetro pelo Método de Bradford.

Para a realização do *Western Blot*, as amostras foram submetidas à eletroforese utilizando o sistema *Phast System*. Cerca de 10 µL da amostra (30 µg) foram misturadas com 10 µl do tampão de amostra (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2,5% SDS (m/v); 1 mM EDTA; 0,01% (v/v) de azul de bromofenol), e 1,5 µl de β-mercaptoetanol (Sigma). A mistura é submetida ao aquecimento e aplicada no gel. A eletroforese é realizada em tampão de corrida para o *PhastGel (SDS Buffer - Amersham Biociences)* a 100 V, durante aproximadamente 40 minutos. Dois géis, exatamente idênticos, são submetidos à eletroforese, um para ser corado e outro para a transferência. Após a eletroforese, o gel a ser corado é incubado por 1 hora em solução fixadora (etanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v), água estéril qsp 0,125L) e, posteriormente, corado com solução de azul brilhante de Coomassie (1,3% ácido fosfórico (v/v), 0,75 M (NH₄)₂ SO₄, 0,1% Coomassie B-Blue G250 (v/v)), durante 18 horas. Em seguida, o gel é lavado de 3 a 5 vezes com água MilliQ, e montado entre duas folhas de papel celofane para a completa secagem.

Após a eletroforese, as proteínas contidas no gel de poliacrilamida são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, pelo método de eletrotransferência semi-seca, com o uso do aparelho *Phast System - Amersham Biociences*, conforme as instruções do fabricante. A eletroforese é realizada em tampão de transferência (0,25 M de Tris-Base; 0,96 M de glicina; 0,5% SDS (sódio duodecil sulfato); água estéril qsp 1L) a 90 V, durante aproximadamente 2 horas e 30 minutos. Concluída a transferência, a membrana é preparada para imunodeteção.

A membrana de nitrocelulose é submetida ao bloqueio de sítios inespecíficos pela adição da solução de bloqueio TBS-T (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20), em 5% de leite em pó (m/v), por cerca de 16 horas. Após o bloqueio, a membrana é lavada rapidamente 2 vezes com TBS 1X, 0,1% Tween-20, e incubada com anticorpo primário monoclonal (QED), diluído em

solução TBS-T (1:800) durante 2 horas à temperatura ambiente, e sob agitação constante. Em seguida, é realizada a lavagem da membrana com TBS 1X, 0,1% Tween-20 (2X / 15 minutos; 3X / 5 minutos), e a membrana é incubada com o anticorpo secundário diluído em solução TBS-T (1:3000), durante 1 hora. Após a
5 incubação com o segundo anticorpo, a membrana é lavada novamente e inicia-se o procedimento de detecção. Para a detecção, é utilizado o "kit ECL Western blotting" (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante. Finalmente, a membrana é exposta ao filme de raio-X por 15 segundos e a revelação é realizada em máquinas automáticas da KODAK.

10 Conforme ilustrado pela figura 7, pode-se observar uma banda imuno-reativa mais intensa do tamanho esperado de 80 kDa, referente a cadeia leve do FVIII e de 90 kDa, referente a cadeia pesada do FVIII, presente nas células recombinantes HepG2/FVIII Δ B_{ST}P140K e a ausência da mesma nas células HepG2 virgens.

15 Como bem compreendem os técnicos no assunto, são possíveis numerosas modificações e variações da presente invenção à luz dos ensinamentos acima, sem se afastar do seu escopo de proteção, conforme delimitado pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUINEA HUMANA, caracterizada pelo fato de que compreende o domínio B reduzido, em que são preservados de 17 a 19 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde de 6 a 8 aminoácidos preservados são do N-terminal, e de 11 a 13 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original, e que apresenta, entre os aminoácidos conservados do N-terminal e do C-terminal, uma serina e uma treonina.
2. PROTEÍNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que são preservados 17 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde 6 aminoácidos preservados são do N-terminal e 11 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original.
3. PROTEÍNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é obtida por linhagens celulares humanas.
4. PROTEÍNA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que as linhagens celulares são humanas hepáticas.
5. PROTEÍNA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a linhagem celular humana é HepG2.
6. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína recombinante do fator VIII, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 5, e veículos, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis.
7. USO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar hemofilia A.
8. USO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é para tratar hemofilia A.

9. USO DE UMA COMPOSIÇÃO, conforme descrita na reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar hemofilia A.

5 10. USO DE UMA COMPOSIÇÃO, conforme descrita na reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que é para tratar hemofilia A.

11. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 a) obtenção de uma molécula de DNA que codifica o fator VIII de coagulação sanguínea humana;

b) amplificação da molécula da etapa (a) por PCR, utilizando primers que restringem a seqüência de nucleotídeos que codifica o domínio B, onde o primer 3' restringe para uma seqüência que codifica de 6 a 8 aminoácidos do N-terminal do domínio B original, e o primer 5' restringe para
15 uma seqüência que codifica de 11 a 13 aminoácidos do C-terminal do domínio B original, em que um dos primers apresenta ainda nucleotídeos que codificam serina (S), e o outro primer apresenta nucleotídeos que codificam treonina (T), que são inseridos entre as seqüências de nucleotídeos conservados do N-terminal e do C-terminal do domínio B;

20 c) introdução da molécula de DNA recombinante de FVIII obtida pela etapa (b) em um vetor;

d) introdução do elemento IRES no vetor da etapa (c), através de enzimas de restrição, após o isolamento por PCR;

e) transfecção de células humanas com o vetor obtido pela etapa (d);

25 f) tratamento da cultura de células humanas com concentrações de drogas quimioterapêuticas e estringência crescentes;

g) cultivo das culturas recuperadas; e

h) recuperação do fator VIII recombinante obtido pelas

mencionadas culturas.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os primers utilizados na etapa (b) apresentam as seguintes seqüências:

5 Primer 1 – 5'-TTCTATCACACGTGACCATGCAAATAGAGCTCTCCACC-3'

Primer 2 – 5'-TTCTATAAAGTACTTGAATTCTGGGAGAAGCTTCTTG-3'

Primer 3 – 5'-TTCTATAAAGTACTCAAACCCACCAGTCTTGAAAC-3'

Primer 4 – 5'-TTCTATACACACGTGTCAGTAGAGGTCCTGTGCC TC-3'.

10 13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é realizada a partir da digestão da molécula da etapa (b) com enzimas de restrição, e ligação da molécula assim tratada ao DNA do vetor linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a enzima de restrição é *Pme I*.

15 15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a etapa (d) é realizada a partir da digestão do vetor da etapa (c) com enzimas de restrição, e ligação do vetor assim tratado ao IRES linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

20 16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as enzimas de restrição são *Pme I* e *Nco HI*.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o vetor é retroviral.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o vetor é pMGF-P140K.

25 19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a transfecção das células humanas com o vetor obtido pela etapa (d) ser realizada através de lipofectamina.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado

pelo fato de apresentar um sistema de produção de retrovírus, em que o FVIII é transfectado em células produtoras de retrovírus anfotrópicas.

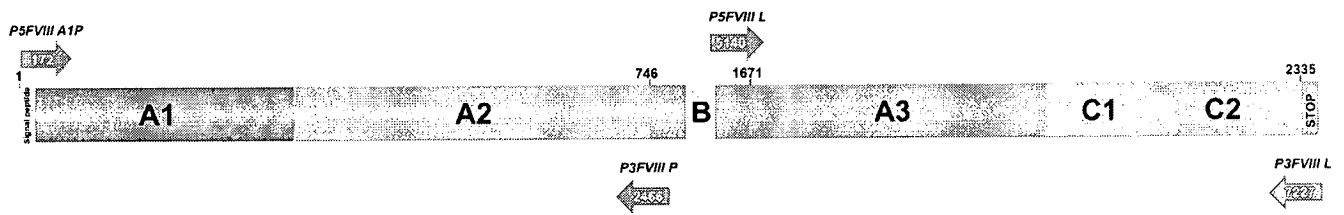
21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as as drogas quimioterapêuticas utilizadas na etapa (f) são O⁶-Benzilguanina e Temozolomide.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as doses crescentes de drogas quimioterapêuticas da etapa (f) estão compreendidas entre 200 a 400 µg/ml na primeira seleção (baixa estringência) e entre 500 a 800 µg/ml na segunda seleção (alta estringência).

23. PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA, caracterizada pelo fato de que é obtida a partir do método conforme descrito em uma das reivindicações 11 a 22, apresentando o domínio B reduzido, onde são preservados 17 a 19 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde de 6 a 8 aminoácidos preservados são do N-terminal, e de 11 a 13 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original, e que apresenta, entre os aminoácidos conservados do N-terminal e do C-terminal, uma serina e uma treonina.

24. PROTEÍNA, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que são preservados 17 aminoácidos do domínio B do FVIII natural, onde 6 aminoácidos preservados são do N-terminal e 11 aminoácidos preservados são do C-terminal do domínio B original.

25. USO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII, conforme descrita em uma das reivindicações 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar hemofilia A.

MOLÉCULA HÍBRIDA RFVIII Δ B_{ST}P140K**Fig. 1**

ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO IRES PRESENTE NO VETOR**RECOMBINANTE PMFG-P140K-IRES⁺**

Query: 6 **ccccctctccctccccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtg** 65
 |||
 Sbjct: 1 **ccccctctccctccccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtg** 60

Query: 66 **tgcgtttgtctatatgtgattttccaccatattgccgtcttttggaatgtgagggcccg** 125
 |||
 Sbjct: 61 **tgcgtttgtctatatgtgattttccaccatattgccgtcttttggaatgtgagggcccg** 120

Query: 126 **gaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaagg**
 185
 |||
 Sbjct: 121 **gaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaagg**
 180

Query: 186 **aatgcaaggtctggtgaatgctggaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagaca**
 245
 |||
 Sbjct: 181 **aatgcaaggtctggtgaatgctggaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagaca**
 240

Query: 246 **aacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgctt**
 305
 |||
 Sbjct: 241 **aacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgctt**
 300

Query: 306 **ctgcgccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgcca**
 365
 |||
 Sbjct: 301 **ctgcgccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgcca**
 360

Query: 366 **cgttgtgagttggatagttgtggaagagtcaaaggctctcctcaagcgtattcaaca**
 425
 |||
 Sbjct: 361 **cgttgtgagttggatagttgtggaagagtcaaaggctctcctcaagcgtattcaaca**
 420

Query: 426 **ggggctgaaggatgccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtg**
 485
 |||
 Sbjct: 421 **ggggctgaaggatgccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtg**
 480

Query: 486 **cacatgctttacatgtgtttagtcgagggttaaaaaa gctctaggccccccgaaccacggg**
 545
 |||
 Sbjct: 481 **cacatgctttacatgtgtttagtcgagggttaaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggg**
 540

Query: 546 **gacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataata** 580
 |||
 Sbjct: 541 **gacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataata** 575

Fig. 2

ESTRATÉGIA PARA A PRODUÇÃO DO *FVIII Δ B_{ST}P140K* NA LINHAGEM CELULAR

HEPG2

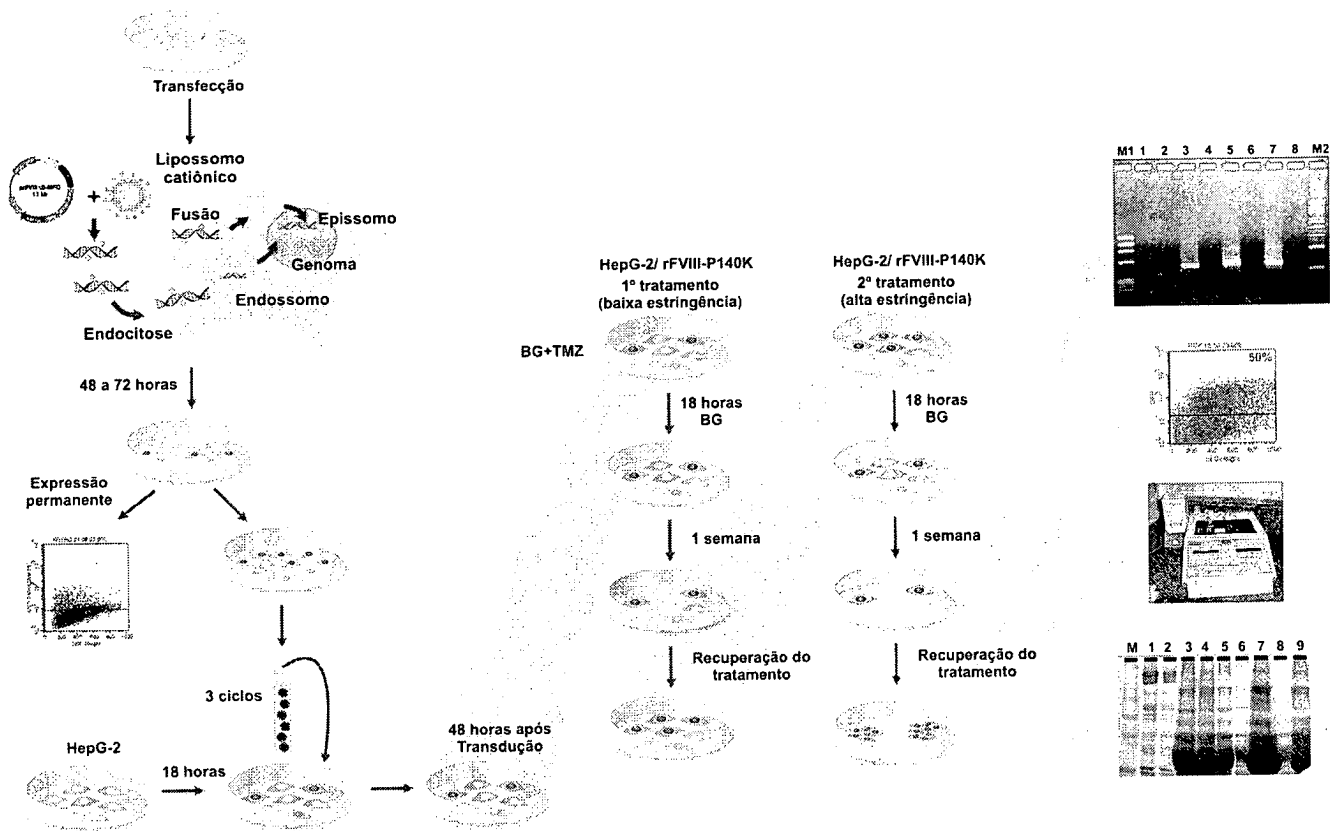


Fig. 3

ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO *FVIII Δ B_{ST}P140K* EM 10 CLONES CELULARES
DE HEPG2/*FVIII Δ B_{ST}P140K*

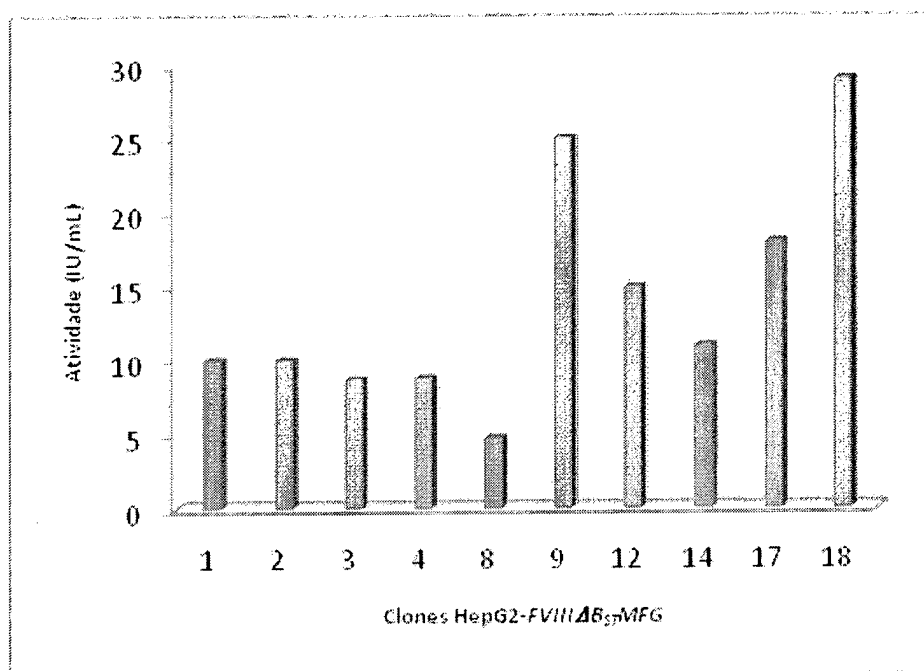


Fig. 4

EXPRESSÃO PERMANENTE DO mRNA RELATIVO AO FATOR VIII NA LINHAGEM CELULAR
HEPG2/FVIII Δ B_{ST}P140K⁺

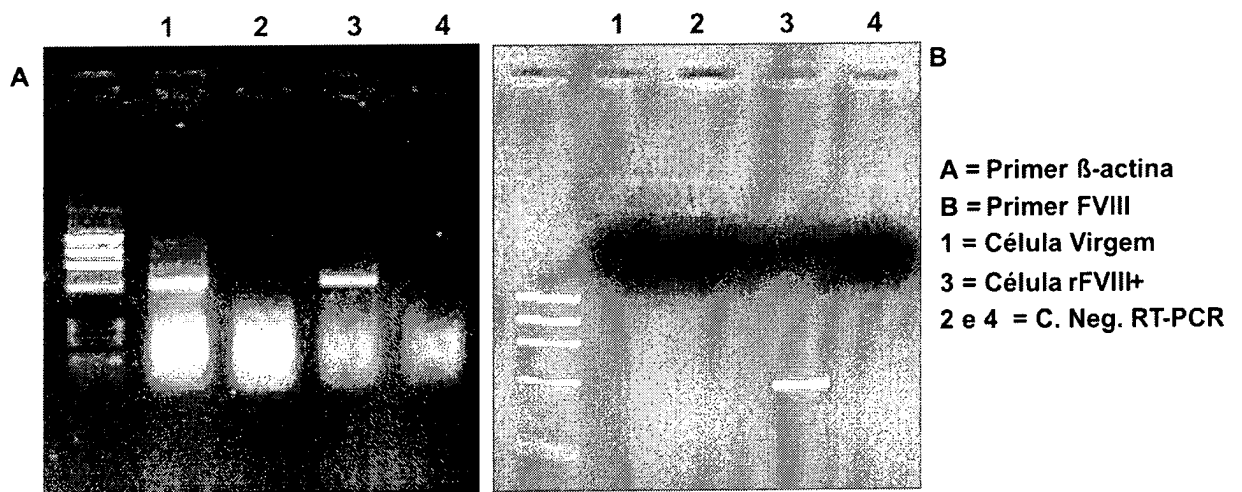


Fig. 5

EXPRESSÃO DE FVIII NA LINHAGEM CELULAR HEPG2/FVIII Δ B_{ST}P140K APÓS O TRATAMENTO COM AS DROGAS QUIMIOTERAPÊUTICAS O⁶-BENZILGUANINA + TEMOZOLOMIDE

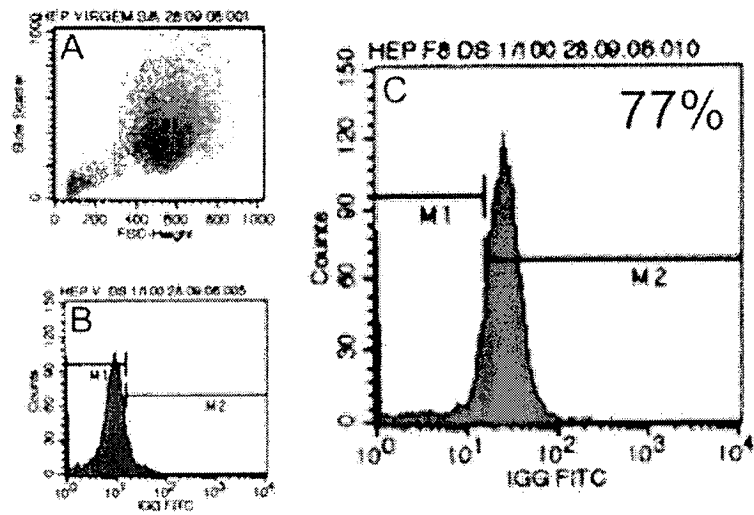
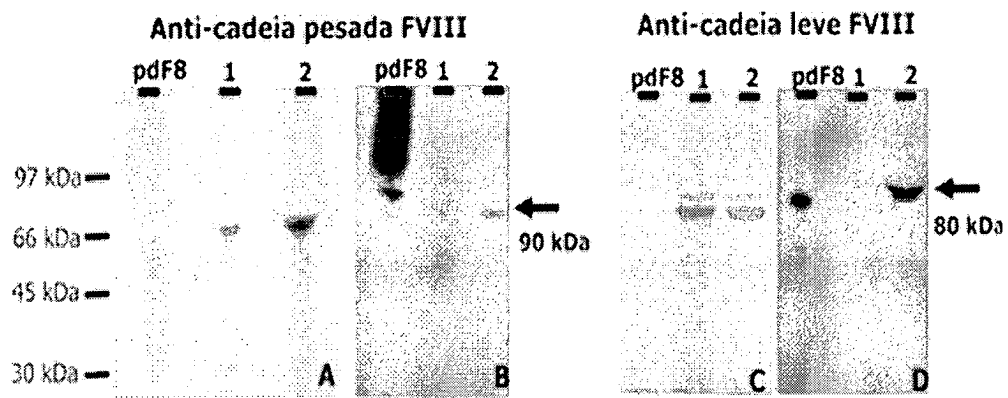


Fig. 6

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO FVIII NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS RECOMBINANTES HEPG2/FVIII Δ B_{ST}P140K E AUSÊNCIA DO MESMO NAS CÉLULAS VIRGENS



A, C = Gel-SDS/PAGE

B = anti-CP-FVIII

D = anti-CL-FVIII

1 = Célula Virgem

2 = Célula rFVIII+

Fig. 7

RESUMO

**“PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE COAGULAÇÃO
SANGUÍNEA HUMANA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA PROTEÍNA
RECOMBINANTE DO FATOR VIII, USO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO
5 DE OBTENÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO FATOR VIII DE
COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA E USO DA MESMA”**

A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana e a uma composição que a contém.

10 A presente invenção trata ainda do uso da proteína ou composição da invenção para a fabricação de um medicamento para tratar hemofilia A.

Adicionalmente, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de uma proteína recombinante do fator VIII de coagulação sanguínea humana.

15 Ainda outro objeto da presente invenção é a proteína recombinante obtida pelo método aqui descrito, e seu uso para preparar um medicamento para o tratamento de hemofilia A.