



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 255**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**A61K 38/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99953425 .8**

86 Fecha de presentación : **10.11.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1129186**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2001**

54 Título: **Polipéptido del factor VIII con actividad de factor VIII:C.**

30 Prioridad: **10.11.1998 AT 1872/98**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2008**

73 Titular/es: **Stichting Sanquin Bloedvoorziening  
Plesmanlaan 125  
1066 CX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es: **Lenting, Petrus, Johannes;  
Van Mourik, Jan, Aart;  
Mertens, Koenraad;  
Pannekoek, Hans;  
Turecek, Peter;  
Schwarz, Hans-Peter y  
Scheiflinger, Friedrich**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 292 255 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptido del factor VIII con actividad de factor VIII:C.

5 La presente invención se refiere al polipéptido de factor VIII modificado (FBI) con actividad de FBI:C, cuyas modificaciones actúan en los dominios A3 y/o C1 de la secuencia de la cadena corta del factor VIII, moléculas de ácido nucleico que codifican dicho polipéptido del factor VIII modificado, vectores y células huésped que contienen las moléculas de ácido nucleico y compuestos que contienen el polipéptido de factor VIII, para el tratamiento de alteraciones de la sangre.

10 La coagulación de la sangre comporta el funcionamiento conjunto de diferentes rutas de reacción homeostática que finalmente llevan a la constitución de trombos. Los trombos son depósitos de componentes de la sangre sobre la superficie de la pared de los vasos y consisten principalmente en plaquetas de sangre agregadas y no disueltas; fibrina reticulada. La constitución de la fibrina tiene lugar por la proteólisis limitada de fibrinógeno por medio de la enzima de coagulación trombina. Esta enzima es el producto final de la cascada de coagulación, una sucesión de activaciones cimogénicas que tiene lugar en la superficie de plaquetas de la sangre activadas y leucocitos y una multiplicidad de células vasculares (ver un resumen en la obra de K. G. Mann y otros, Blood, 1990, Bd. 76, S.1-16).

20 Una función clave en la cascada de coagulación consiste en la activación del factor X por el complejo procedente del factor IX activado (factor IXa) y factor VIII activado (factor VIIIa). La deficiencia o disfunción de los componentes de estos complejos está relacionada con la enfermedad de la sangre conocida como hemofilia (J. E. Sadler & E. W. Davie: Hemofilia A, Hemofilia B y enfermedad de von Willebrand's, en G. Stamatoyannopoulos y otros (Hrsgb): Base molecular de las enfermedades de la sangre. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, S.576-602). La hemofilia A se refiere a una deficiencia de la actividad de factor VIII, mientras que la hemofilia B se refiere a una deficiencia del factor IX. El tratamiento actual comprende la terapia de intercambio con utilización de preparados farmacéuticos que comprenden los factores normales de la coagulación. De estas alteraciones de la coagulación, la más frecuente es la hemofilia A, de la que están afectados aproximadamente uno entre cada 10000 hombres. La terapia de intercambio en la hemofilia A comprende la administración repetida de preparados que comprenden el factor normal VIII por medio de infusión intravenosa. El intervalo entre las infusiones queda determinado por la eliminación de la actividad del factor VIII en la circulación de la sangre. El tiempo medio de la actividad de factor VIII después de la infusión depende de cada individuo y está comprendido entre 10 y 30 horas aproximadamente. Por esta razón, para una terapia profiláctica es necesaria una infusión cada dos a tres días. Esto presenta una fuerte carga para la vida de los pacientes hemofílicos, especialmente cuando por la formación local de cicatrices por las frecuentes inyecciones para la infusión intravenosa se hace difícil el acceso venoso. Sería especialmente ventajoso que se pudiera reducir la frecuencia de infusiones por la utilización de un factor VIII con un tiempo activo medio más largo. El tiempo activo medio del factor VIII puede ser prolongado al actuar en el mecanismo de la eliminación del factor VIII (Clearance), por ejemplo por reducción de la afinidad del factor VIII para receptores que juegan un papel en su eliminación, bien sea directo, en el que se modifica el factor VIII en sus lugares de constitución para los receptores correspondientes de eliminación (Clearance), o bien de forma indirecta de manera que se utilizan compuestos que atacan el efecto cambiante del factor VIII con estos receptores. La constitución de estos agentes se ha visto dificultada no obstante hasta el momento por el hecho de que no se conocía el mecanismo de eliminación (Clearance) del factor VIII, las células receptoras e involucradas en este proceso y los lugares moleculares involucrados en la acción de cambio de los receptores al factor VIII.

45 En el plano molecular existe un conocimiento limitado en cuanto al mecanismo de eliminación del factor VIII. La proteína del factor VIII es sintetizada como polipéptido de cadena individual de 2332 aminoácidos con la estructura de dominios típica A1-A2-B-A3-C1-C2 (G.A. Vehar y otros, Nature, Bd.,312, 1984, S.337-342; J.J. Toole y otros, Nature, Bd. 312, 1984, 342-347). A causa del tratamiento endoproteolítico intracelular, el factor VIII actúa como complejo heterodímero de cadenas largas y cortas en el torrente sanguíneo. Las cadenas cortas comprenden los residuos de aminoácidos 1649-2332 y comprende los dominios A3-C1-C2. Las cadenas largas comprenden los dominios A1-A2-B (residuos 1-1648) y es heterogénea a causa de la proteólisis limitada en una serie de posiciones dentro del dominio B. El heterodímero del factor VIII no tiene actividad biológica alguna pero actúa como cofactor del enzima de factor IXa después de activación proteolítica por trombina o factor Xa activo. La proteólisis actúa tanto en la cadena larga como en la cadena corta del factor VIII (M.J.S.H. Donath y otros, J. Biol. Chem. Bd. 270, 1995, S.3648-3655) y conduce a la división de un fragmento amino terminal de la cadena corta y a una división de lugares de unión del dominio en la cadena larga (entre los dominios A1-A2 y A2-B). El cofactor activado es denominado factor VIIIa y es un heterotrímero que comprende el dominio A1, A2 y la cadena corta que comprende los dominios A3-C1-C2.

60 En este sector es bien conocido que el tiempo de actividad medio del heterodímero del factor VIII no activado depende fuertemente de la existencia del factor de von Willebrand que presenta una fuerte afinidad para el factor VIII (pero no por el factor VIIIa) y que actúa como soporte de la proteína (J.E. Sadler y E.W. Davie: Hemofilia A, Hemofilia B y enfermedad de von Willebrand's en G.Stamatoyannopoulos y otros (Hrsgb): Base molecular de las enfermedades de la sangre. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, S. 576-602). Es conocido que pacientes con la enfermedad de von Willebrand's del tipo 3, que no presentan factor de von Willebrand's detectable en su torrente sanguíneo, presentan también una deficiencia secundaria de factor VIII. Además, el tiempo de actividad medio del factor VIII administrado por vía intravenosa en estos pacientes de 2 a 4 horas, era notablemente más corto que los tiempos observados en pacientes de hemofilia A de 10 a 30 horas.

Estas comprobaciones implican que el factor VIII tiende a una desaparición rápida del torrente sanguíneo, y que este proceso, en cierta manera, es inhibido por la formación de complejo con su soporte natural, factor de von Willebrand. No obstante, el tiempo medio de actividad o vida útil sigue siendo indeseablemente reducido.

5 Recientemente, se dio a conocer en un informe que el factor VIII activado mediante trombina se une al Low Density Lipoprotein-Rezeptor-Protein ("LPR") ("proteína del receptor de lipoproteína de baja densidad") ("LPR") (A. Yakhyaev y otros, Blood, Bd. 90 (Suppl. 1), 1997, 126-I (Abstracto)). Este abstracto describe la absorción de células y la desaparición de fragmentos de factor VIII activado por trombina, e informa que los dominios A2, pero no las otras dos subunidades del heterotrímero del factor VIIIa, aparecen en acción recíproca en LRP unidos a células. Los  
10 autores deducen que las uniones de dominio A2 a LRP desestabilizan adicionalmente la acción recíproca libre de los dominios A2 en el heterotrímero del factor VIIIa y, por lo tanto, regulan de modo descendente la actividad del factor VIIIa.

Es conocido que el LRP es uno de los receptores que juegan un papel en la eliminación de diferentes proteínas.  
15 LRP es conocido en este sentido también como receptor de alfa2-macroglobulina, y pertenece a la familia de los receptores de Low Density Lipoprotein ("lipoproteína de baja densidad") (LDL). Está compuesto por dos cadenas de polipéptido unidas de forma no covalente: una cadena alfa (515 kDa) y una cadena beta (85 kDa) [como resumen, consultar D.K. Strickland y otros, FASEB J Bd.9, 1995, S. 890-898]. El LRP es un receptor multiligando para catabolismo de lipoproteína y de proteinasa. La cadena beta contiene un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta, que  
20 es esencial para endocitosis. La cadena alfa actúa como ectodominio grande y contiene tres tipos de repeticiones: dominios epidérmicos del tipo de factor de crecimiento, secuencias Tyr-Trp-Thr-Asp y dominios de clase A de receptor de LDL. Estos dominios de clase A se encuentran en cuatro clústers separados, el llamado clúster I (2 dominios), II (8 dominios), III (20 dominios) y IV (11 dominios), para los cuales se ha demostrado que juegan un papel en la unión de ligandos. El LRP es extraído de múltiples tejidos, en especial, de placenta, pulmones, cerebro e hígado. En el hígado,  
25 el LRP se encuentra en células de parenquima y células "cobre". Además, el LRP es extraído de una serie de tipos de células, tales como fibroblastos, células de músculos lisos, células Leydig y Sertoli, y monocitos. La diferenciación de monocitos con respecto a macrófagos está relacionada con una drástica subida en la expresión de LRP. Finalmente, se extrae también el LRP de otros tipos de células, tales como, células de riñón de monos (COS) o células de ovarios de hámster chino (CHO) (D.J. FitzGerald y otros, J. Cell Biol. Bd. 129, 1995, S. 1533-1541), ambas utilizadas para  
30 la expresión de proteínas de mamíferos, incluyendo factor VIII (R.J. Kaufman y otros, Blood Coag. Fibrinol. Bd. 8 (Suppl. 2), 1997, S. 3-14).

El LRP juega un papel en la eliminación de múltiples ligandos, incluyendo proteasas, inhibidores de tipo Kunitz, complejos proteasa-serpina, lipasas y lipoproteínas, es decir, el LRP juega un papel esencial en diferentes procesos de  
35 eliminación fisiológica y patofisiológica (Narita y otros, Blood, Bd. 2, S. 555-560, 1998; Orth y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., Bd. 89, S. 7422-7426, 1992; Kounnas y otros, J. Biol. Chem., Bd. 271, S. 6523-6529, 1996). Su significación fisiológica se deduce especialmente de la comprobación de que ratones LRP "Knock-out" no sobreviven al estadio embrionario (Herz, J. Curr. Opin. Lipidol. Bd. 4, 1993, S. 107-113). La secreción de LRP puede quedar dificultada por lo tanto, lo cual aparece con múltiples ligandos en acción recíproca. Dentro de las células, el LRP está asociado con  
40 su proteína de caperuza a la proteína asociada al receptor (RAP). Cuando está unida a RAP, el LRP puede presentarse con sus ligandos conocidos en acción recíproca (Herz y otros, J. Biol. Chem., Bd. 266, S. 21232-21238, 1991).

La acción recíproca del LRP con sus ligandos naturales puede ser bloqueada de forma efectiva por fragmentos  
45 sueltos de LRP. Éstos pueden ser conseguidos mediante múltiples métodos conocidos en este sector, incluyendo las técnicas recombinantes, y se consideran como tales una introducción a antagonistas efectivos de LRP (I.R. Horn, J. Biol. Chem., Bd. 272, 1997, S. 13608-13613; B. Vash y otros, Blood, Bd. 92, 1998, S. 3277-3285).

Teniendo en cuenta el papel típico del LRP en la eliminación de proteasas, inhibidores y complejos de proteasa-inhibidor, se ha comprobado que el LRP se une también con el cofactor no enzimático del factor VIIIa (A. Yakhyaev  
50 y otros, Blood Bd. 90 (Suppl. 1), 1997, 126-I (Abstracto)). Si bien esta constatación significa un papel del LRP en la regulación del factor VIIIa, carece de indicación alguna sobre el papel en la regulación de LRP de factor VIII heterodímero no activado, aunque ello fuera de interés para la eliminación del factor VIII del torrente sanguíneo y, por lo tanto, para el tiempo de vida media del factor VIII.

55 En el estado de la técnica, se han llevado a cabo múltiples investigaciones para mejorar el perfil farmacocinético del factor VIII, incluyendo modificaciones en diferentes regiones del polipéptido FVIII:

El documento WO 87/07144 describe diferentes modificaciones en lugares de corte proteolíticos, que comprenden  
60 residuos de arginina y lisina, para reducir la labilidad de las moléculas para una división específica catalizada por proteasa, por ejemplo, para reducir el lugar de corte del factor Xa entre Arg 1721 y Ala 1722.

Los documentos WO 95/18827, WO 95/18828 y WO 95/18829 describen derivados de factor VIII con modificaciones en la zona A2 de la cadena larga.

65 El documento WO 97/03193 da a conocer análogos al polipéptido de factor VIII, en los cuales se comprenden las modificaciones de la variación de las características de unión de la molécula con los metales.

## ES 2 292 255 T3

En el documento WO 97/03195 se describen análogos al polipéptido C del factor VIII, en los que se prevén modificaciones en uno o varios residuos de aminoácidos, que limitan con un residuo Arg.

5 El documento EP-0 808 901 describe la construcción de variantes del factor VIII, como mínimo con una mutación, como mínimo en una región inmunodominante del factor VIII y la utilización de estas variantes de factor VIII para el tratamiento de pacientes con inhibidores del factor VIII. Estas modificaciones no conducen a un mayor tiempo medio de vida y una mayor estabilidad de las variantes del factor VIII, ni *in vivo* ni tampoco *in vitro*.

10 Se han descrito mutaciones en la zona de los dominios C2 del factor VIII (R2307Q, R2307L, R2305F y Y2332F) por Pipe y otros (JBC, 271 (41) (1996), 25671-25676).

15 Teniendo en cuenta el estado de la técnica ninguno de los documentos conocidos da a conocer indicación alguna de que la modificación de la cadena corta del factor VIII conduzca a una afinidad de unión modificada con respecto al receptor celular y, en base a ello, a una menor eliminación de la proteína del factor VIII y a un tiempo de vida media más prolongado y mayor estabilidad del factor VIII.

Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención dar a conocer un polipéptido del factor VIII con actividad de factor VIII:C con mayor periodo de vida media y/o mayor estabilidad de la proteína del factor VIII *in vivo* y/o *in vitro*.

20 De acuerdo con este objetivo la presente invención da a conocer un polipéptido de factor VIII humano con actividad de factor VIII:C, el cual presenta una modificación entre AS 1743 (Phe) y 1749 (Arg), As 1784 (Ser) y 1831 (Asp), AS 1888 (Ser) y 1919 (His), AS 1942 (Trp) y 1947 (Met), AS 1959 (Ser) y 1974 (Ala), As 2037 (Ile) y 2062 (Trp), AS 2108 (Asp) y 2118 (Asn) y/o AS 2154 (Thr) y 2158 (Ile), de manera que la modificación es una mutación, delección o inserción que reduce la afinidad de unión con respecto al LRP (todas las numeraciones de aminoácidos que se adoptan en la solicitud presente con respecto a la secuencia del factor VIII se refieren a la numeración de Vehar y otros (Nature, Bd. 312, 1984, S. 337-342)).

30 Preferiblemente se encuentra la modificación en el dominio C1 entre AS 2037 (Ile) y 2062 (Trp), AS 2108 (Asp) y 2118 (Asn) y/o AS 2154 (Thr) y 2158 (Ile). De manera todavía más preferente se encuentra la modificación entre AS 2112 (Trp) y 2115 (Tyr).

35 Dentro del marco de la presente invención se deduce que la inhibición de LRP por sus antagonistas, RAP, conduce a la acumulación de cadena corta de factor VIII en el medio. Esto indica que la capacidad celular del heterodímero de factor VIII comprende un mecanismo dependiente de LRP.

De manera sorprendente se ha demostrado que las codificaciones objeto de la invención conducen a un efecto similar, es decir, a un tiempo de vida media más elevado y a mayor estabilidad de la proteína de factor VIII.

40 En base a la modificación en molécula de factor VIII aumenta la afinidad de unión con respecto a LRP y se inhibe la rápida desaparición de la proteína. Esta comprobación abre nuevas posibilidades para un mejor tratamiento de alteraciones de la coagulación, lo cual podría ser necesario para la fabricación de compuestos de factor VIII.

45 En base a la modificación en el polipéptido del factor VIII, el aumento de la vida media útil *in vivo* e *in vitro* de la molécula del factor VIII, de acuerdo con la presente invención, asciende como mínimo 10%, preferentemente 25%, más preferentemente 50% y más preferentemente 90% con respecto a la proteína de tipo salvaje del factor VIII.

50 Este polipéptido del factor VIII o variantes del factor VIII de acuerdo con la presente invención muestran su efecto favorable por el hecho de que muestran regiones interactivas (lugares exo, "Exosites") que se encuentran en las subunidades de los heterodímeros de factor VIII, en especial en la cadena corta del factor VIII (dominios A3-C1-C2). La expresión "lugar exo" se utiliza en esta descripción en sentido amplio y se refiere a la parte relativamente hidrofílica de la proteína que está principalmente dirigida hacia la superficie de la molécula del factor VIII (Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol., Bd. 157, S. 105-132, 1982).

55 A pesar de que este procedimiento funciona de acuerdo con principios Kyte y Doolittle que ya son conocidos en este sector y que se basan en la secuencia del factor VIII, tal como se ha publicado con anterioridad, estos lugares exo-hidrofílicos no han merecido hasta el momento prácticamente atención alguna.

60 Por ejemplo, el lugar exo de AS Ser 1784 hasta Asp 1831 incluye la zona de unión de factor IX, que ya ha sido descrita en la literatura (AS 1801 hasta 1823, P.J. Lenting y otros, Biol. Chem., Bd. 271, S. 1935-1940). Esta es una clara indicación de la relevancia de los gráficos de hidropatía que han sido utilizados para la identificación de los lugares exo. La expresión "lugar de unión" se refiere en esta descripción a una secuencia típica de aminoácidos, incluyendo análogos naturales y sintéticos de los mismos que presentan las mínimas necesidades para la unión de factor VIII no activado a LRP.

65 En un primer grupo de formas de realización especialmente preferentes de la invención el polipéptido presenta una modificación en uno o varios lugares exo dentro de la secuencia del polipéptido del factor VIII, preferentemente la cadena corta del factor VIII y, de manera más preferente, los dominios A3 y C1 del factor VIII. Además, se originan

estos polipéptidos preferentemente de la secuencia del factor VIII humano a pesar de que la invención comprende lugares de unión que se basan en lugares exo del factor VIII de cualquier especie deseada de mamífero.

La modificación puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante *in vitro*-mutagénesis dirigida o PCR u otros métodos de la técnica genética que pertenecen al estado de la técnica que son apropiados para la modificación específica de una secuencia de ADN para el intercambio de aminoácidos (Current Protocols in Molecular Biology, Bd. 1, Kap. 8 (Ausubel y otros, Hrsgeb., J. Wiley and Sons, 1989 & Supp. 1990-93); Protein Engineering (Oxender & Fox Hrsgeb., A. Liss, Inc. 1987)). Esta modificación puede ser una mutación, delección o inserción en la zona de la cadena corta.

La presente invención prevé además los ácidos nucleicos que codifican para cada una de las proteínas modificadas del factor VIII que están comprendidas en la presente invención. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN. El ácido nucleico está comprendido en un vector de expresión que comprende los elementos apropiados para la expresión de dicho ADN o ARN. El vector de expresión puede presentar, por ejemplo, en la dirección de transcripción una región de regulación transcripcional y una región de iniciación translacional que son funcionales en una célula asociada, una secuencia de ADN que codifica el polinucleótido de FVIII de la presente invención y regiones de terminación translacional y transcripcional que son funcionales en esta célula asociada, de manera que la expresión de esta secuencia nucleica es regulada mediante las regiones de inicio y de terminación. El vector de expresión puede comprender también elementos para la replicación este ADN o ARN. El vector de expresión puede ser un vector ADN- o bien ARN-. Por ejemplo, los vectores de expresión ADN- son pBPV, pSVL, pRc/CMV, pRc/RSV, sistema de vectores miógenos (WO 93/09236), o bien vectores que proceden de un sistema de virus, por ejemplo, de virus de Vaccinia, Adenovirus, virus adenoasociados, virus de herpes, retrovirus o baculovirus. Son ejemplos para vectores de expresión ARN- vectores que proceden de virus ARN-, tales como retrovirus o flavivirus.

Para algunas utilidades específicas en terapia genética, es decir, cuando los ácidos nucleicos son inyectados en un órgano de un mamífero, los ácidos nucleicos, ADN y también ARN pueden ser modificados químicamente. Las modificaciones químicas pueden ser modificaciones que protegen los ácidos nucleicos frente a digestión de nucleasa, por ejemplo, por estabilización del esqueleto o de los terminales.

El vector de expresión que contiene el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de factor VIII modificado de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado para la transformación de células huésped que entonces generan este polipéptido. Las células huésped transformadas pueden ser cultivadas en un sistema de cultivo celular para generar este polipéptido *in vitro*. Las células huésped pueden segregar el polipéptido de factor VIII modificado en el medio de cultivo celular del cual pueden ser separadas. Las células huésped pueden contener el polipéptido de factor VIII modificado también en sus paredes celulares y la proteína híbrida puede ser producida a partir de las células huésped.

Las células huésped pueden ser células que proceden del cuerpo de un mamífero, por ejemplo, fibroblastos, queratinocitos, células hematopoiéticas, hepatocitos o mioblastos que son transformadas *in vitro* con un sistema detector de expresión que soporta un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, pudiendo ser reimplantadas en el mamífero. El polipéptido de factor VIII codificado por este ácido nucleico será sintetizado *in vivo* por estas células y éstas mostrarán una actividad biológica deseada en el mamífero. De acuerdo con una forma de realización específica, el mamífero es un paciente humano que está afectado por hemofilia.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de factor VIII, modificado de acuerdo con la presente invención, puede ser utilizado también para conseguir animales transgénicos que expresan *in vivo* esta proteína de polipéptido de factor VIII modificado. En una forma de realización de esta utilización específica, los animales transgénicos pueden generar el polipéptido de factor VIII en glándulas endógenas, por ejemplo, glándulas de los senos, de las que se pueden separar estas proteínas. En el caso de glándulas mamarias pueden ser separadas esas proteínas de factor VIII de la leche de los animales, de la que se pueden producir estas proteínas. Los animales pueden ser ratones, vacas, cerdos, cabras, ovejas, conejos o cualquier otro animal utilizable económicamente.

El vector de expresión que contiene el ácido nucleico que codifica todos los polipéptidos de factor VIII que está comprendido dentro de la presente invención, puede ser administrado además a un mamífero sin transformación previa *in vitro* en las células huésped. El fondo práctico para este tipo de terapia de genes se ha publicado en múltiples solicitudes de patentes, por ejemplo, en el documento WO 90/11092. El vector de expresión que contiene ese ácido nucleico será mezclado con un soporte adecuado, por ejemplo, una solución fisiológica tampón e inyectada en un órgano, preferentemente un músculo de esqueleto, la piel o el hígado de un mamífero. El mamífero es preferentemente un humano y, de modo más preferente, un humano que sufre de un defecto genético, de modo más preferente, el humano está afectado de una alteración de la coagulación de la sangre. En una forma de realización específica, el mamífero es un paciente humano que está afectado de hemofilia y el ácido nucleico que está comprendido en el vector de expresión, codifica para el polipéptido de factor VIII modificado, tal como se ha descrito.

Es ventajoso que la proteína de factor VIII modificado de acuerdo con la presente invención presente una actividad procoagulante de factor VIII de 50% como mínimo, más preferentemente de 80% como mínimo, en especial, como mínimo 100% de la actividad procoagulante del factor VIII de una proteína del factor VIII sin modificación, lo que conduce a una menor afinidad de unión con respecto al LRP, por ejemplo, de un preparado de factor VIII del tipo disponible comercialmente que se basa en factor VIII:C recombinante o plasmático.

## ES 2 292 255 T3

La evaluación de la actividad procoagulante del factor VIII puede ser llevada a cabo con cualquier prueba adecuada, en especial, con cualquier prueba que en la investigación de sondas de factor VIII sea realizada de manera rutinaria, tal como la prueba de coagulación de una fase, tal como por ejemplo la descrita en la publicación de Mikaelsson y Oswaldson, Scand. J. Haematol. Suppl. 33, S. 79-86, 1984, o bien una prueba cromogénica tal como la de Factor VIII IMMUNOCHROM (Immuno).

La actividad del factor VIII puede ser determinada también por la medición de la capacidad del factor VIII en actuar como cofactor para el factor IXa en la transformación de factor X a factor Xa, de manera que se utilizará un sustrato cromógeno para el factor Xa (Coatest Factor VIII, Chomogenix, Moenlndal, Suecia). Además, se pueden llevar a cabo otras pruebas que sirven además para confirmar la magnitud de la actividad de factor VIII en una probeta, a efectos de comprobar la actividad de factor VIII de las proteínas modificadas que se describen en la presente invención.

La prueba real de si una nueva proteína de factor VIII modificada presenta un determinado porcentaje de actividad procoagulante de factor VIII se lleva a cabo preferentemente de forma paralela con una prueba en la misma molécula de factor VIII sin la modificación en el dominio de la unión LRP (por ejemplo un tipo salvaje de factor VIII o un factor VIII completamente activo con dominio de deleciónado). En una prueba de este tipo, en la molécula de factor VIII con mutación se puede investigar la actividad procoagulante relativa (porcentaje de la actividad en comparación con la actividad al 100% del tipo salvaje o del factor VIII con deleción de dominios B) sin riesgo de fallos debidos a factores del medio. Dado que en las pruebas *in vitro* de actividad procoagulante de factor VIII los resultados se ven influidos frecuentemente por fallos que se deben atribuir a su naturaleza artificial, se investigan ambas características preferentemente también con pruebas *in vivo* o *ex vivo* para mantener resultados más fiables con respecto a los valores de la actividad.

Igual que en las pruebas *in vitro*, también es preferible la prueba en paralelo de la molécula del factor VIII sin la modificación, cuando se llevan a cabo pruebas *in vivo*. Se describen modelos de animales apropiados para la evaluación de la actividad del factor VIII:C en los documentos WO95/01570 y EP0747060.

La preparación de acuerdo con la presente invención puede ser prevista como preparación farmacéutica con polipéptido de factor VIII modificado, de acuerdo con la presente invención, preparación de componente único o en combinación con otros componentes como sistema de componentes múltiples. En una forma de realización especial se pueden combinar las proteínas de factor VIII o la molécula de factor VIII modificada, de acuerdo con la invención, con uno o varios polipéptidos que inhiben la unión e internalización del factor VIII por medio de la proteína asimilada al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP), de manera que el polipéptido es RAP.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención prevé una composición que presenta una molécula de factor VIII y uno o varios polipéptidos que atacan de forma antagonista en el efecto mutuo entre factor VIII y LRP y, por lo tanto, inhiben de manera selectiva la unión e internalización del factor VIII mediante la proteína asociada a la liproteína de baja densidad (LRP). Preferentemente, este polipéptido es RAP o bien un fragmento soluble de LRP con efecto antagonista. Preferentemente, el fragmento de LRP soluble se une al factor VIII de la región de unión FVIII-LRP.

Estas preparaciones pueden ser utilizadas como componentes activos de los compuestos farmacéuticos para el tratamiento de pacientes que están afectados de disturbios genéticos, preferentemente disturbios de la coagulación y, de modo más preferente, la hemofilia, por ejemplo hemofilia A. Estos compuestos pueden ser utilizados además como componente activo de compuestos farmacéuticos para el tratamiento de pacientes que en casos de alteraciones están afectados en sus sistemas tromboticos o fibrinolíticos, por ejemplo durante o después de una operación.

De acuerdo con la presente invención, se determina un compuesto farmacéutico para la administración a mamíferos, particularmente humanos. En la fabricación del producto farmacéutico, los compuestos de la presente invención, polipéptido de factor VIII modificado, los ácidos nucleicos que codifican para estos o las células transformadas que pueden expresar las mismas *in vivo*, se mezclan con soportes fisiológicamente aceptables.

Los compuestos que se dan a conocer en la presente invención pueden ser formulados para su administración por cualquier vía apropiada, y la invención comprende también los compuestos farmacéuticos que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de factor VIII. Dichos compuestos pueden ser formulados en las formas conocidas hasta el momento con utilización de uno o varios soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los soportes apropiados comprenden medios de dilución o sustancias de carga no estando excluidos medios acuosos estériles y diferentes medios disolventes orgánicos no tóxicos. Los compuestos pueden ser formulados en forma de polvos, suspensión o soluciones acuosas, soluciones inyectables u otras. Se pueden identificar por parte de los expertos las formas de dosificación apropiadas.

El procedimiento, según la presente invención, para el tratamiento de alteraciones de la coagulación debe ser llevado a cabo con utilización de un esquema de dosificación que garantice la máxima reacción terapéutica hasta conseguir una mejora y, después de ello, la cantidad mínima efectiva que garantice una protección apropiada contra las hemorragias. La dosificación para la administración intravenosa puede variar entre 10 y 300 IE/Kg de peso corporal aproximadamente, preferentemente entre unos 10 y 100 IE/Kg de peso corporal y, de forma más preferente, entre 20 y 40 IE/Kg de peso corporal. La dosificación apropiada puede depender también del estado de salud general del paciente, su edad y otros factores que pueden influir en la reacción frente al producto farmacéutico. El producto farmacéutico puede ser administrado por infusión continua o a intervalos regulares para mantener el efecto terapéutico al nivel deseado.

## ES 2 292 255 T3

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de moléculas de factor VIII modificadas de acuerdo con la invención, que presentan una modificación en la cadena corta. La secuencia que codifica para la molécula de factor VIII modificada es insertada en un sistema de expresión adecuado, por ejemplo un vector de expresión, y se transfectan las células apropiadas con el ADN recombinante. De manera preferente, se establecen líneas celulares permanentes que expresan el factor VIII modificado. La células son cultivadas en las condiciones óptimas para la expresión genética y el factor VIII modificado será aislado o bien de un extracto de cultivo celular o de un resto de cultivo celular. La molécula recombinante puede ser aislada mediante cualquier otro método cromatográfico conocido, tales como intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de afinidad o de inmutafinidad o una combinación de los mismos.

El factor VIII modificado será producido preferentemente por expresión recombinante. Puede ser fabricado en una ruta genética técnica con cualquier sistema de expresión habitual, tal como por ejemplo líneas celulares permanentes o sistemas de expresión viral. La líneas celulares permanentes son fabricadas mediante integración estable del ADN externo en el genoma de las células huésped de, por ejemplo, Vero-, MRC5-, CHO-, BHK-, 293-, Sk-Hep1-, en especial células de hígado y de riñón, fibroblastos, queratinocitos o mioblastos, hepatocitos o células madre (excepto células madre embrionales), por ejemplo células madre hematopoyéticas, o a través de un vector episomal que se genera, por ejemplo, de papilomavirus. Los sistemas de expresión de virus, tales como por ejemplo sistemas de virus Vaccinia, sistemas de baculovirus o de retrovirus, pueden ser utilizados igualmente. Como líneas celulares se utilizarán en general Vero-, MRC5-CHO, BHK-, 293-, Sk-Hep1-, así como células de las glándulas, hígado y riñón. Como sistemas de expresión eucarióticos pueden ser utilizados de macaco, glándulas endógenas (por ejemplo glándulas de animales transgénicos) y también otros tipos de células. Naturalmente se pueden utilizar también animales transgénicos para la expresión de los polipéptidos, según la invención, o derivados de los mismos. Para la expresión de proteínas recombinantes se han mostrado como apropiadas especialmente las células CHO-DHFR (Urlaub y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Bd. 77, S. 4216-4220, 1980).

Para la fabricación recombinante de factor VIII modificado de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar también sistemas de expresión procarióticos. Son especialmente apropiados sistemas que posibilitan la expresión en *E. Coli* o en *B. Subtilis*.

El polipéptido de factor VIII, de acuerdo con la presente invención, es expresado en los sistemas de expresión correspondientes bajo el control de un promotor apropiado. Para la expresión en Eukariotes son apropiados todos los promotores conocidos tales como SV40, CMV, RSV, HSV, EBV,  $\beta$ -Actin, hGH o bien promotores inducibles tales como por ejemplo HSP o bien promotor metalotiónico.

De acuerdo con la presente invención se puede utilizar un factor VIII-cDNA de longitud total, así como los derivados correspondientes del mismo que presentan actividad de factor VIII:C (por ejemplo mutantes de factor VIII con delección de dominios B, mutantes FVIII con dominios B deleccionados parcialmente), material de partida para la construcción del polipéptido de factor VIII modificado. Pueden proceder de cualquier especie de mamífero, preferentemente de humanos, cerdos o vacas.

La invención se describirá a continuación mediante los ejemplos que se muestran. Si bien se ha indicado a título de ejemplo la presente invención en relación con la identificación, fabricación y utilización de compuestos mejorados con menor capacidad de unión de la cadena corta del factor VIII a LRP, la invención se debe considerar de manera tal que también es utilizable para las uniones de LRP de cadenas largas de factor VIII. Las variantes dentro del campo del experto en la materia se deberán considerar también que se encuentran dentro de la presente invención. Si no se define de otro modo, todas las expresiones técnicas y científicas utilizadas tienen el mismo significado con el que se deben comprender de manera general por el experto de tipo medio de la zona a la que pertenece la presente invención. Si bien se pueden utilizar en la práctica o para las pruebas de la presente invención todos los métodos y materiales que son similares o equivalentes a los que se describen, los métodos y materiales preferentes se describirán a continuación.

Los siguientes ejemplos y figuras muestran la siguiente invención que en modo alguno limitan el alcance de la misma.

La figura 1 muestra el efecto mutuo entre el factor VIII (Tabla A), factor VIII activado con trombina (factor VIIIa, Tabla B), cadena pesada de factor VIII (Tabla C) o cadena ligera de factor VIII (Tabla D) y el LRP inmovilizado con utilización de análisis de resonancia Plasmon de superficie. Los detalles se muestran en el ejemplo I. La comparación de las Tablas A-D muestra que el factor VIII, el factor VIII activado por trombina y la cadena corta del factor VIII actúan de manera eficaz con el LRP en efecto mutuo pero no con la cadena pesada del factor VIII.

La figura 2 muestra que la cadena ligera del factor VIII se une de forma reversible y dependiente de la dosis a LRP inmovilizado. Los parámetros cinéticos de este efecto mutuo están reunidos en la Tabla II que se muestra en el ejemplo II. La unión se determina tal como se describe en el ejemplo II.

La figura 3 muestra el efecto de los antagonistas de LRP RAP y la concentración de la cadena corta de factor VIII en un medio con respecto a las células que expresan la cadena corta del factor VIII. Las investigaciones fueron llevadas a cabo tal como se describe en el ejemplo III. En ausencia de RAP (símbolos abiertos) el aumento de la cadena corta del factor VIII en el medio es menor que en su contrario (símbolos cerrados).

## ES 2 292 255 T3

La figura 4 muestra el efecto de los antagonistas de LRP RAP sobre la concentración del heterodímero intacto de factor VIII en el medio de las células que expresan el factor VIII. Los detalles de la investigación se han descrito en el ejemplo IV. En ausencia de RAP (símbolos abiertos) el aumento de la actividad de factor VIII es menor que en su ausencia (símbolos cerrados).

Las figuras 5 A y B muestran gráficos de hidropatía de los dominios A3, C1 y C2 de la cadena ligera del factor VIII.

El gráfico se ha realizado tal como se ha descrito en el ejemplo VI. El gráfico muestra la existencia de diferentes regiones individuales con valores reducidos de hidropatía, los cuales muestran la característica hidrofílica de lugares Exo expuestos potencialmente. Estos se han mostrado como A-K (figura 5A) y I-IV (figura 5B).

La figura 6 muestra el efecto mutuo del dominio C2 del factor VIII con LRP inmovilizado en la ausencia de anticuerpos ESH-8 dirigido a los dominios C2. La unión se analizó con utilización de resonancia superficial Plasmon, tal como se ha descrito en el ejemplo VII. En ausencia de dominio C2, ESH-8 no muestra ninguna unión significativa a LRP inmovilizado. No obstante, en presencia del dominio C2 se observa un aumento de la unión a LRP dependiente de la dosis. Esto muestra que el dominio C2 de factor VIII se une a LRP.

La figura 7 muestra la unión del dominio C2 de factor VIII a LRP en presencia de ESH4.

La figura 8 muestra el efecto de LRP sobre la expresión de factor VIII-A3-C1 en células CHO-K1.

### Ejemplos

#### Ejemplo I

La cadena corta de factor VIII tiene un punto de unión a LRP.

La unión de factor VIII y subunidades del mismo a proteína asociada a receptor de lipoproteína de baja (LRP) fue investigada con utilización de componentes purificados. LRP, factor VIII, cadena corta de factor VIII, cadena larga de factor VIII, factor VIII activado con trombina, fueron conseguidos con utilización de procedimientos ya establecidos (Moestrup S.K. y otros, J. Biol. Chem., Bd. 266, 1991, S. 14011-14017; Lenting P.J y otros, J. Biol. Chem. Bd. 269, 1994, S.7150-7155; bzw. Curtis J.E. y otros, J. Biol. Chem. Bd 269, 1994, S.6246-6250).

El efecto mutuo con LRP fue investigado con utilización del análisis de resonancia superficial Plasmon (SPR) mediante un sistema BIAcore™ 2000-Biosensor-System (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La LRP fue inmovilizada con una concentración de 8,3 fmol/mm<sup>2</sup> sobre un chip CM5-Sensor, en el que el conjunto de acoplamiento de amina fue utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pharmacia, Biosensor, Uppsala, Suecia). Se activó y bloqueó un canal de control en el chip Sensor de manera que se utilizaron reactivos de acoplamiento de amina sin inmovilización de proteína.

Se condujeron factor VIII o derivados del mismo en una concentración de 100 nM con intermedio del canal de control para valorar la unión no específica y con intermedio del canal con recubrimiento de LRP en 50 mM HEPES (Ph 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,005% (V/V) Tween-20 con un flujo de 5 ml/minuto durante un tiempo de dos minutos a 25°C. La asociación entre las diferentes proteínas y LRP se ha mostrado en la figura 1 y se ha indicado en unidades de resonancia. La tabla 1 muestra el aumento máximo de las unidades de resonancia para los diferentes derivados. Estos datos muestran que el factor VIII, factor VIII activado con trombina y la cadena corta del factor VIII pueden tener efecto mutuo con LRP. Por el contrario, la cadena larga del factor VIII no se pudo unir a LRP. Por lo tanto, es evidente que la parte de unión del factor VIII o del factor VIII activado con trombina para LRP se encuentra en la región A3-C1-C2 (residuos 1690-2232).

TABLA 1

*Unión de factor VIII y de sus sub-unidades a LRP inmovilizada tal como se ha mostrado por la utilización de análisis SPR. La unión a LRP se ha mostrado en forma de unidades de resonancia y se ha corregido teniendo en cuenta la unión no específica*

Proteína	Unión (Unidades de resonancia)
Factor VIII	262
Cadena larga del factor VIII	0
Cadena corta del factor VIII	305
Factor VIII activado con trombina	446

## Ejemplo II

*Cinética de asociación de LRP inmovilizado y de la cadena corta de factor VIII*

5 Los parámetros cinéticos para el efecto mutuo entre la cadena corta de factor VIII y LRP inmovilizada se determinaron con utilización del análisis SPR mediante un sistema BIAcore™2000-Biosensor-System (Farmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Este procedimiento es conocido universalmente en este sector y se utilizó, por ejemplo, para el análisis cinético del efecto mutuo entre LRP y proteína asociada a receptor (RAP) (Horn I, en LRP-ligand interactions: kinetics and structural requirements; p.H.D.-Dissertation, 1997, S.65-106, Universidad de Ámsterdam). La LRP fue inmovilizada con una concentración de 6,7 fmol/mm<sup>2</sup> en tres canales de un chip sensor CM5 tal como se ha descrito en el ejemplo I. Se preparó un canal de control para la valoración de la unión no específica tal como se ha descrito en el ejemplo I. Se condujeron diferentes concentraciones de cadena corta de factor VIII (150, 175, 200, 225 y 250 nM) mediante el canal de control y mediante los canales recubiertos con LRP en 50 mM HEPES (Ph 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM NaCl<sub>2</sub> y 0,005% (V/V) Tween 20 con un flujo de 20 ml/minuto durante un periodo de tiempo de 2 minutos a 25°C de manera que pueda tener lugar esta asociación. Posteriormente los canales fueron incubados con el mismo tampón con un flujo similar de manera que pueda tener lugar la disociación. Tal como se ha mostrado en la figura 2 se observaron curvas de asociación y de disociación dependientes de la dosis.

20 Los datos fueron analizados mediante software de evaluación Biacore (Farmacia Biosensor, Uppsala, Suecia). El análisis de los datos mostró que el efecto mutuo entre la cadena corta de factor VIII con dos tipos de puntos de unión proporcionaba la mejor correspondencia. Posteriormente se calcularon las constantes de velocidad de asociación y de disociación ( $k_{on}$  bzw.  $k_{off}$ ) para ambos puntos de unión. Estas constantes de velocidad fueron utilizadas posteriormente para conseguir las constantes de afinidad ( $K_d$ ) para estos efectos mutuos.

TABLA II

25 *Constantes de velocidad para el efecto mutuo entre las cadenas cortas de factor VIII y LRP inmovilizada. Los datos de análisis se refieren al efecto mutuo de cadena corta de factor VIII con dos clases de puntos de unión que se han representado como A y B*

Clase	$K_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_d (=k_{off}/k_{on} \cdot nM)$
A	$3,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-2}$	182
B	$7,2 \times 10^4$	$2,7 \times 10^{-3}$	37

## Ejemplo III

*Efecto mutuo entre la cadena corta de factor VIII y LRP unida a células*

40 Dado que la cadena corta de factor VIII se une de forma eficaz a LRP en un sistema en el que se utilizan componentes purificados, se ha investigado el efecto mutuo entre la cadena corta de factor VIII y LRP que se expresará en la superficie de células vivas. Para expresar la cadena corta de factor VIII, es decir, los residuos 1649 hasta 2332 (Toole J.J. y otros, Nature, Bd. 312, 1984, páginas 342-347), se ha preparado un constructo que codifica para el péptido de señal del factor VIII que está fusionado con los restos 1649 a 2332. Este constructo fue preparado de la manera siguiente. El anteriormente descrito plásmido pBPV-Factor VIII-dB695 (K. Mertens y otros, Brit. J. Haematol., Bd.85, 1993, páginas 133-142) se utilizó como base para la fabricación de dos fragmentos de factor VIII, de manera que se utilizó la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Se preparó un fragmento en el que se utilizaron el cebador de sentido A1 (5'-TTA GGA TCC ACC ACT ATG CAA ATA GAG CTC TCC-3'), que contiene un punto de reconocimiento de BamHI y una parte que codifica para los residuos de terminal N del péptido de señal VIII y del cebador antisentido A1 (5'-AGT AGT ACG AGT TAT TTC ACT AAA GCA GAA TCG-3'), que codifica para los residuos de terminal C del péptido de señal VIII y los residuos de terminal N de la cadena corta de factor VIII. Se preparó un segundo fragmento en el que se utilizaron el cebador de sentido B-1 (5'-TTG CGA TTC TGC TTT AGT GAA ATA ACT CGT ACT AC-3') que codifica para los residuos de terminal C del péptido señal de factor VIII y los residuos de terminal N de la cadena corta de factor VIII y el cebador antisentido B-1 (5'-ATT GCG GCC GCT CAG TAG AGG TCC TGT GCC TC-3') que presenta un lugar de reconocimiento NotI, un codón de interrupción y una parte que codifica para los residuos de terminal C de la cadena corta de factor VIII. En una segunda reacción se utilizaron unos productos de ambas reacciones como base para la construcción del fragmento resultante designado como factor VIII-SPLC, de manera que se utilizaron los cebadores A1 y B1. El factor VIII-SPLC comprendía un lugar de reconocimiento BamHI, una parte de codificación del péptido de señal de factor VIII que estaba fusionada con una parte de codificación de la cadena corta de factor VIII, un codón de interrupción y un lugar de identificación NotI. El factor VIII-SPLC fue digerido a continuación con BamHI y NotI y ligado en el vector de expresión pcDNA3, 1 (Invitrogen, Leek, Holanda) que fue cultivado con utilización de la misma enzima de restricción. El vector resultante con la designación pcFactor VIII-LC fue transfectado en células(CHO-K1) de ovarios de hamster chino K1 (ATCC CCL-61)de manera que se utilizó precipitación por fosfato cálcico (J. Sambrook y otros, Molecular Cloning; A laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring HARBOR, U.S.A., 1989, S.1637). Se estableció que las células CHO-K1 expresaban

## ES 2 292 255 T3

LRP constitutiva de su superficie celular (D. J. FitzGerald y otros, J. Cell, Biol., Bd.129, 1995, páginas 1553-1541). Se consiguieron células CHO-K1 de expresión estable con selección con G-148 (Gibco-BRL, Breda, Holanda) con una concentración de 800 µg/ml.

5 Se cultivaron células CHO-K1 que expresaban de manera estable la cadena corta de factor VIII en dos cavidades de una placa de 6 cavidades (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) hasta conseguir confluencia. Las cavidades fueron lavadas cinco veces con utilización de medio de Eagle F12 medio (DMEM-F12) (Gibco, BRL, Breda, Holanda) modificado por Dulbeccos y se administró 1 ml DMEM-F12. En una de las cavidades se administró el RAP antagonista-LRP hasta una concentración de 20 mg/ml de manera inmediata y 2 y 4 horas después del lavado de las células. Se recogieron  
10 células 6 horas después del lavado de las células y posteriormente se analizó la concentración de cadena corta de factor VIII de manera que se utilizó un procedimiento conocido en este sector (Lenting P. J. y otros, J. Biol. Chem. Bd. 269, 1994, páginas 7150-7155). Tal como se muestra en la figura 3 la concentración de cadena corta de factor VIII aumentó en el medio en el transcurso del tiempo en ausencia de RAP. En presencia de RAP aumenta, no obstante, la magnitud de la subida de la cadena corta de factor VIII en comparación con la ausencia de RAP. Por lo tanto, la inhibición  
15 de LRP está unida a una acumulación de cadena corta de factor VIII en el medio. Esto muestra claramente que un mecanismo dependiente de LRP juega un papel en la captación de células de la cadena corta de factor VIII.

### Ejemplo IV

20 *Efecto mutuo entre factor VIII y proteína asociada a receptor de lipoproteína de baja densidad con superficie celular expuesta*

Tal como se ha descrito en el ejemplo III, se produce un efecto mutuo entre la cadena corta del factor VIII y el LRP expuesto en la superficie celular. Los inventores han investigado por lo tanto si la proteína de factor VIII intacta tenía  
25 efecto mutuo con LRP con superficie celular expuesta. Se cultivó una línea celular de fibroblastos de ratón establecida previamente que fue transfectada de manera estable para generar factor VIII (Mertens K. y otros, Brit J. Haematol., Bd. 85, 1993, 133-142) en 2 cavidades de una placa con 6 cavidades hasta confluencia (nunc A/S, Roskilde, Dinamarca). Las células fueron lavadas cinco veces con utilización del medio de Eagle modificado Iscoves (IMEM) (Boehringer Ingelheim/Biowhitaker, Verviers, Bélgica) y se añadió 1 ml de IMEM. En una de las cavidades se añadió el RAP antagonista de LRP hasta una concentración de 20 mg/ml de forma inmediata y 2 y 4 horas después del lavado de  
30 las células. Se tomaron muestras hasta 6 horas después del lavado y posteriormente se analizaron con respecto a la actividad de cofactor de factor VIII para lo que se utilizó un procedimiento ya establecido (Mertens K. y otros, Brit. J. Haematol., Bd. 85, 1993, 133-142). Tal como se ha mostrado en la figura 4, la actividad de cofactor del factor VIII aumenta en el medio con el transcurso del tiempo en ausencia de RAP. En presencia de RAP aumenta no obstante la magnitud del aumento de factor VIII en comparación con la ausencia de RAP. Por lo tanto la inhibición de LRP está  
35 unida a una acumulación de factor VIII en el medio. Es evidente por lo tanto que un mecanismo dependiente de LRP juega un papel en la absorción de células de la cadena corta de factor VIII.

### Ejemplo V

40 *Efecto de RAP sobre la farmacocinética de factor VIII en ratones tratados con fuerte deficiencia de factor VIII*

Por métodos de técnicas genéticas se consiguieron células madre de ratón con fuerte deficiencia de factor VIII (FVIII) mediante alteración controlada de genes de factor VIII de ratones Bi y otros, Nature Genetics, 1995, Bd. 10,  
45 páginas 119-121. Se consiguió factor VIII de ratones tratados mediante inserción de un neogen en el terminal 3' del Exon 17 de los genes de factor VIII de ratones. Los animales humanos involucrados (X'Y) no tenían niveles de factor VIII detectables de  $<0,02 \pm 0,01$  E/ml cuando se realizaron mediciones con una prueba cromogénica de factor VIII Hyland Immuno, Viena, Austria, tal como se describe brevemente en (Turecek y otros, Tromb. Haemostas, Suppl., 1997, Bd.769), o bien mediante antígeno ELrSA tal como se describe más adelante.

50 Dos ratones hemocigóticos humanos involucrados (X'Y) fueron tratados por vía intravenosa con una dosis de 200 E/kg de peso corporal de un preparado de factor VIII humano recombinante (rhFVIII) procedente de células de ovario de hamster chino que se consiguieron del modo descrito (WO/85/01961), y se formularon farmacéuticamente sin proteína estabilizante.

55 Bajo acción de narcóticos, una hora después del tratamiento, se seccionó la punta de la cola de los ratones con un escalpelo, tal como se ha descrito por Novak y otros, Brit J. Haematol Bd. 69, 1998, páginas 371-378. Se reunió un volumen de 50 µl de sangre con tubos capilares (Ringcaps, Hirschmann, Alemania) de la herida de la cola de manera que los tubos capilares fueron recubiertos con litio-heparina como anticoagulante. Los tubitos capilares fueron cerrados  
60 y centrifugados para separar las células de la sangre del plasma. Posteriormente se abrieron los tubitos capilares y se reunieron las fracciones celulares y de plasma mediante otra centrifugación. Finalmente las probetas de plasma fueron sometidas a determinación de factor VIII mediante antígeno Elisa de factor VIII, equipo de pruebas INMUNOZYM FVIII Ag, Hyland Inmuno, Viena, Austria, con utilización de anticuerpos monoclonales antifactor VIII tanto para la captación como para la comprobación, tal como se ha descrito (Stel y otros, Nature, 1983, Bd. 303, S.530-532; Lenting y otros J. Biol. Chem. Bd. 269, 1994, S. 7150-7155; Leyte y otros, Biochem, J. Bd. 263, 1989, S.187-194). Los valores de factor VIII resultante fueron indicados en unidades internacionales de factor VIII humano. Los resultados del nivel de factor VIII en plasma se han mostrado en la tabla.

## ES 2 292 255 T3

Otros dos ratones hemicigóticos humanos (X<sup>h</sup>Y) fueron tratados con proteína asociada a receptor recombinante (GST-RAP) 10 minutos antes del tratamiento con factor humano FVIII recombinante con una dosis de 40 mg/kilo de peso corporal. El RAP utilizado en esta investigación que mostraba efecto mutuo con LRP fue conseguido por fermentación bacteriana tal como se ha descrito por Hertz y otros, (J. Biol. Chem. Bd. 266, 1991, s. 21232-21238). Una proteína de fusión del RAP con glutatión-S-transferasa fue expresada en *E. Coli* y purificada mediante cromatografía de afinidad sobre glutatión-agaroso. La proteína resultante contenía principalmente proteína de fusión y productos de fraccionamiento de RAP y glutatión-S-transferasa. La proteína de fusión fue formulada en un tampón inyectable para su administración a un ratón tratado con factor VIII. Igual que para el grupo de control (tratamiento solamente con factor VIII) se sacaron muestras de sangre 1 hora después de la administración de factor VIII recombinante y medido en actividad de factor VIII con utilización del antígeno ELISA del factor VIII.

Los resultados se explican en la Tabla III.

TABLA III

	Dosis de tratamiento	Dosis de tratamiento	Recuperación 1 h después del tratamiento
Ratón n°	GST-RAP	rhFVIII	FVIII:Ag (E/ml plasma)
1	40 mg/kg	200 E/kg	1,92
2	40 mg/kg	200 E/kg	1,88
3	-	200 E/kg	0,73
4	-	200 E/kg	0,83

En ratones tratados previamente con GST-RAP el nivel del factor VIII ascendió a más de 200% del nivel de plasma después del tratamiento con factor VIII recombinante solamente. La administración de los antagonistas LRP, RAP, mejoró la farmacocinética del factor VIII.

### Ejemplo VI

#### *Identificación de potenciales lugares exo de unión a LRP en la cadena corta del factor VIII*

Se estableció un procedimiento para la identificación de lugares exo que juegan un papel posiblemente en el efecto mutuo proteína-proteína (J. Kyte y R.F. Doolittle, J. Mol. Biol. Bd. 157, 1982, páginas 105-132). Este procedimiento prevé un programa que evalúa el carácter hidrofílico e hidrofóbico de una proteína a lo largo de su secuencia de aminoácidos de manera continua. En el procedimiento se utiliza una escala de hidropatía que reproduce la hidropatía promedio dentro de segmentos de una determinada dimensión a lo largo de la secuencia de aminoácidos. Las secciones hidrofílicas se caracterizan por valores de hidropatía negativos y presentan probablemente una orientación hacia la cara externa de una proteína que se encuentra en una solución acuosa. Este procedimiento se utilizó en la secuencia conocida del factor VIII humano (G.A. Vehar y otros, Nature, Bd. 312, 1984, páginas 337-342; J.J. Toole y otros, Nature, Bd. 312, 1984, 342-347), de manera que se utilizó una dimensión de segmento ("ventana") de 19 residuos. De la secuencia completa del factor VIII se sometió a este análisis la región 1690-2332, que corresponde al dominio factor VIII A3/C1/C2 y el gráfico de hidropatía resultante, que tiene un valor de -15 como "corte", se ha mostrado en las figuras 5A y 5B.

Este procedimiento mostró varias regiones separadas con reducidos valores de hidropatía que refleja la naturaleza hidrofílica que está relacionada con lugares exo potenciales. Éstos se han indicado como A-K (Tabla IV):

## ES 2 292 255 T3

TABLA IV

Lugar	Residuo	Dominio
5 A	Met 1711 hasta Gly 1725	A3
B	Phe 1743 hasta Arg 1749	A3
C	Ser 1784 hasta Asp 1831	A3
D	Ser 1888 hasta His 1919	A3
E	Trp 1942 hasta Met 1947	A3
10 F	Ser 1959 hasta Ala 1974	A3
G	Ile 2037 hasta Trp 2062	C1
H	Asp 2108 hasta Asn 2118	C1
I	Thr 2154 hasta Ile 2158	C1
15 J	Arg 2209 hasta Phe 2234	C2
K	His 2269 hasta Lys 2281	C2

TABLA V

Lugar	Residuo	Dominio
20 I	Phe 1785 hasta His 1822	A3
II	Trp 1889 hasta Asn 1915	A3
III	Trp 2112 hasta Tyr 2115	C1
25 IV	His 2211 hasta Leu 2230	C2

Nuevamente se sometió a este análisis de la secuencia completa del factor VIII la región 1690-2332, que corresponde a la cadena corta de factor VIII completo, y el gráfico resultante de hidropatía, que tiene un valor de "corte" de -20, se ha mostrado en la figura 5B. Los lugares exo se han mostrado en I-IV.

### Ejemplo VII

*El dominio C2 del factor VIII contiene un lugar de unión a LRP*

La región A3-C1-C2 del factor VIII comprende la parte de unión para LRP (ver Ejemplo I). Esta región contiene una serie de potenciales lugares exo de unión a LRP en los dominios que constituyen, incluyendo el dominio C2 (ver Ejemplo VI). Para la confirmación de que dichos lugares exo pueden jugar realmente un papel en la unión a LRP se analizó de manera más precisa el efecto mutuo entre LRP y el dominio C2 del factor VIII. El dominio C2 del factor VIII (es decir, los restos 2172-2332) se expresó en células de insectos con utilización de un método ya establecido (K. Fijnvandraat y otros, Blood, Bd. 91, 1998, páginas 2347-2352). El dominio C2 del factor VIII fue purificado mediante cromatografía de inmunoafinidad con utilización del anticuerpo monoclonal dirigido al dominio C2 CLB-CAG 117 (K. Fijnvandraat y otros, Blood, Bd. 91, 1998, páginas 2347-2352). El efecto mutuo con LRP fue investigado con utilización del análisis de resonancia plasmón superficial en un sistema BIAcore™2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La LRP fue inmovilizada sobre un chip sensor CM5, tal como se ha descrito en el Ejemplo I. Para la amplificación de la señal de resonancia el dominio C2 del factor VIII (0, 100 o 375 nM) fue preincubado en presencia de 500 nM del anticuerpo monoclonal dirigido al dominio C2 ESH-8 (D. Scandella y otros, Blood, Bd. 86, 1995, páginas 1811-1819) en 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005% (V/V) Tween-20 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de ello se condujeron sondas preincubadas por el canal de control para evaluar la unión no específica, así como por el canal con recubrimiento de LRP (8,3 fmol/mm<sup>2</sup>), con un flujo de 5 ml/minuto, a lo largo de 2 minutos, a una temperatura de 25°C.

En ausencia del dominio C2 el ESH-8 muestra, cuando existe, una unión mínima a LRP inmovilizada. No obstante, en presencia del dominio C2 se observó un aumento de la unión a LRP dependiente de la dosis (figura 6). Esto muestra que el dominio C2 del factor VIII se une a LRP. Por lo tanto, los lugares exo dentro de la cadena corta del factor VIII presentan muy probablemente la capacidad de una unión a LRP y de este modo, la capacidad de jugar un papel en la eliminación de factor VIII dependiente de LRP *in vivo*.

### Ejemplo VIII

*Unión del dominio C2 de FVIII en presencia de un anticuerpo de dominio C2 anti-FVIII*

La molécula de FVIII comprende dos lugares que están involucrados en la unión vWf, de manera que uno de estos lugares se encuentra en los terminales carboxi del dominio C2 de la cadena corta del factor VIII (Saenko y Scandella, J.B.C. 272 (1997), páginas 18007-18014). Dado que la unión vWF es inhibida por el anticuerpo ESH4 dirigido al dominio C2, se investigó este efecto sobre la unión a LRP de manera que se realizaron investigaciones de anticuerpo-cuerpo de unión tal como en el Ejemplo VII. El anticuerpo ESH4 fue conseguido de la firma American Diagnostica.

## ES 2 292 255 T3

Tal como se muestra en la figura 7, el ESH4 interfiere con la unión de LRP a la cadena corta de factor VIII. Esta inhibición parece ser específica puesto que ESH4 no estaba en condiciones de influir en la unión de complejos de tipo tejido de activador de plasminógeno/activador de plasminógeno-inhibidor-1 a LRP. Además, otros anticuerpos que estaban dirigidos contra la cadena corta de factor VIII, a saber CLB-CAG A y CLB-CAG 69 (Lenting y otros, J.B.C. 269 (1994), páginas 7150-7155), no se encontraban en condiciones de interferir con LRP en cuanto a la unión a factor VIII.

En la figura 7 se ha mostrado la unión del dominio C2 de factor VIII a LRP en presencia de ESH4. En este caso se incubó LRP inmovilizada ( $16 \text{ fmol/mm}^2$ ) con la cadena corta de factor VIII (150 nM) en presencia o ausencia de anticuerpo ESH4 con una corriente de  $5 \mu\text{l/min}$  durante 2 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . Los resultados se indicaron en unidades de resonancia (resonance units; RU) y se corrigieron contra uniones no específicas que se producían en menos de 5% con respecto a la unión de LRP a canales dotados de recubrimiento.

En la figura 7 se representó la concentración del anticuerpo ESH4 en nM en el eje de las x y la unión restante de la cadena corta de factor VIII en RU sobre el eje de las y.

### Ejemplo IX

#### *La región A3-C1 del factor VIII presenta un lugar de unión a LRP*

La región A3-C1-C2 del factor VIII comprende la parte de unión para LRP (ver Ejemplo I). Del análisis cinético descrito en el Ejemplo II se observa claramente que existen múltiples lugares, que juegan un papel en la LRP (Tabla II, puntos de unión de la clase A y de la clase B). Tal como aparece en el Ejemplo VII, la existencia de estos lugares interactivos fue comprobada para la región del dominio C2 del factor VIII (ver también figura 6). A efectos de comprobación de que también otros lugares exo juegan un papel en el efecto mutuo con LRP, se analizó el efecto mutuo entre LRP y la región A3-C1 del factor VIII (es decir, los restos 1649 hasta 2172 del factor VIII). Para conseguir el fragmento de la cadena corta de este factor VIII se preparó un constructo que codificaba para el péptido de señal del factor VIII que está fusionado con los residuos 1649 hasta 2172. Este constructo fue preparado de la manera siguiente. El vector pfactor VIII-LC, que se ha descrito en el Ejemplo III, fue utilizado como plantilla de conformación para la construcción de un fragmento de factor VIII con utilización de PCR. Este fragmento fue producido con utilización del cebador de sentido A1 ( $5' \text{-TTA GGA TCC ACC ACT ATG CAA ATA GAG CTC TCC-3'}$ , o bien Ejemplo III) y del cebador antisentido FA2172 min ( $5' \text{-AAT GCG GCC GCT TCA ATT TAA ATC ACA GCC CAT-3'}$ ). El cebador FA 2172 codifica para un punto de identificación NotI, un codón de interrupción y los residuos 2167 hasta 2172 del Factor VIII. El producto PCR fue fraccionado con BspMII y NotI, y se aisló un fragmento de 352 pares de bases y ligado con el vector pfactor VIII-LC, que fue digerido con utilización de la misma enzima de restricción. El vector resultante que fue designado pfactor VIII-A3C1, fue transfectado a células CHO-K1 (ATCC CCL-61) con utilización de precipitación de fosfato cálcico (J. Sambrook y otros, Molecular Cloning; A laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1989, páginas 1637), las células CHO-K1, que expresan de manera estable los fragmentos A3-C1 del factor VIII, fueron conseguidas con una selección de G-148 (Gibco-BRL, Breda, Holanda) con una concentración de  $800 \mu\text{g/ml}$ .

Las células CHO-K1 que expresan de manera estable los fermentos A3-C1 del factor VIII fueron utilizadas para el cultivo en gran extensión para conseguir un medio acondicionado que contiene el factor VIII A3-C1. El factor VIII A3-C1 fue purificado mediante cromatografía de inmunoafinidad de manera que se utilizó el anticuerpo monoclonal anteriormente descrito CLB-CAG A (Leyte A. y otros, Biochem. J., 1989, Bd. 263, páginas 187-194), el cual está dirigido contra el dominio A3 del factor VIII. Con este objetivo se inmovilizó CLB-CAG A en CNBr-Sefarosa 4B (Pharmacia Biotech, Roosendaal, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una concentración de  $1 \text{ mg/ml}$ . Se incubó medio acondicionado con CLB-CAG A-Sefarosa ( $2 \text{ ml}$  por litro de medio), y se eluyó el factor VIII A3-C1 unido en  $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $55 \text{ (V/V)\%}$  de etilenglicol,  $25 \text{ mM}$  lisina (pH 11). Las fracciones que contenían el factor VIII A3-C1 fueron neutralizadas inmediatamente con utilización de  $1/10$  en volumen de imidazol  $1 \text{ M}$  (pH 5,0) y posteriormente se dializaron contra  $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $2 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $0,005\% \text{ (V/V)}$  Tween-20,  $20 \text{ mM HEPES}$  (pH 7,4).

El efecto mutuo entre el factor VIII A3-C1 y LRP fue investigado con utilización del análisis de resonancia plasmón superficial con un sistema BIAcore<sup>TM</sup>2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La LRP fue inmovilizada sobre un chip sensor CM5, tal como en el Ejemplo 1. Probetas que contenían el factor VIII A3-C1 ( $200 \text{ nM}$  o  $400 \text{ nM}$ ) fueron conducidas con una corriente de  $5 \mu\text{l/min}$  durante 2 minutos a  $25^\circ\text{C}$  por el canal de control, para evaluar la unión no específica y con el canal de superposición de LRP ( $8,3 \text{ fmol/mm}^2$ ). En la Tabla VI se reúne el aumento máximo de las unidades de resonancia para ambas concentraciones del factor VIII A3-C1. En presencia de  $400 \text{ nM}$  de factor VIII A3-C1 se observó una reacción más elevada que en  $200 \text{ nM}$  de factor VIII A3-C1 ( $59$  o  $47$  unidades de resonancia). Para mejorar la unión del factor VIII A3-C1 a LRP, se incubó de modo previo factor VIII A3-C1 ( $400 \text{ nM}$ ) en presencia de  $500 \text{ nM}$  del anticuerpo monoclonal (CLB-CAG A en  $50 \text{ mM HEPES}$  (pH 7,4),  $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $2 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $0,005\% \text{ (V/V)}$  Tween 20 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las probetas previamente incubadas fueron conducidas por el canal de control y con intermedio del canal de superposición de LRP con una corriente de  $5 \text{ ml/min}$  durante 2 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . En presencia del anticuerpo CLB-CAG A se observó realmente un aumento de la reacción ( $118$  unidades de resonancia). Por lo tanto, estos datos demuestran claramente que el factor VIII A3-C1 puede actuar con efecto mutuo con LRP de forma dependiente de la dosis.

## ES 2 292 255 T3

TABLA VI

*Unión del factor VIII A3-C1 a LRP inmovilizada, tal como se ha indicado con utilización del análisis SPR. La unión a LRP se ha indicado en unidades de resonancia y se ha corregido por la unión no específica*

Concentración A3-C1	Unión (unidades de resonancia)
200 nM	47
400 nM	59
400 nM + 500 nM CLB-CAg A	118

### Ejemplo X

*Efecto mutuo entre factor VIII A3-C1 y proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad con superficie celular expuesta*

Tal como se ha descrito, el factor VIII A3-C1 (es decir, los residuos 1649 hasta 2172) puede mostrar efecto mutuo con LRP purificada. Los inventores han investigado además el efecto mutuo entre el factor VIII A3-C1 y LRP expresada en la superficie de células vivas. Para ello, células CHO-K1, que expresan de forma estable el factor VIII A3-C1 (tal como se ha descrito anteriormente), fueron cultivadas hasta confluencia en 6 cubetas de una placa de 24 cubetas (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca). Las cavidades o cubetas fueron lavadas cinco veces con utilización de medio DMEM-F12 (Gibco-BRL, Breda, Holanda), y se añadieron 500  $\mu$ l de DMEM-F12. En tres cubetas se añadió el antagonista de LRP RAP en una concentración de 1  $\mu$ M a las 2 y 4 horas después del lavado de las células. Las probetas fueron retiradas a las 6 horas después del lavado y posteriormente se analizaron en cuanto a la concentración de factor VIII A3-C1. Las concentraciones de factor VIII A3-C1 fueron determinadas esencialmente con utilización de un procedimiento descrito en este sector (Lenting P.J. y otros, J. Biol. Chem., Bd. 269, 1994, páginas 7150-7155) además de que se utilizó el anticuerpo monoclonal CLB-CAg 12 en vez de CLB-CAg 117. Tal como se ha mostrado en la figura 8, aumentó la concentración de factor VIII A3-C1 en el transcurso del tiempo en ausencia de RAP. No obstante, en presencia de RAP aumenta el exceso de factor VIII A3-C1 en comparación con la ausencia de RAP. Por lo tanto, la inhibición de RAP está relacionada con una acumulación de factor VIII A3-C1 en el medio. Esto muestra que en la absorción de factor VIII A3-C1 en las células juega un papel un mecanismo dependiente de LRP.

La figura 8 muestra el efecto del antagonista de LRP RAP sobre la concentración de factor VIII A3-C1 en un medio de células que expresan el factor VIII A3-C1. En ausencia de RAP (símbolos abiertos) el aumento de factor VIII A3-C1 muestra cantidades menores que en su presencia (símbolos cerrados). Los datos representan el valor medio  $\pm$  la desviación estándar de tres investigaciones.

### Ejemplo XI

*Las mutaciones en el dominio C2 del factor VIII influyen la unión a LRP*

Tal como se ha descrito en el ejemplo VII, el dominio C2 del factor VIII muestra un lugar de unión para LRP. Por lo tanto, los inventores han investigado el efecto de mutaciones en este dominio con respecto a la unión de factor VIII o bien efecto mutuo con LRP que está expuesta en la superficie de las células. Para expresar variantes del factor VIII que presentan dichas mutaciones se prepararon dos constructos. Ambos plásmidos de expresión del factor VIII eran derivados del plásmido pF8-SQ#428 (F. Scheiflinger, resultados no publicados); un plásmido, que contiene el cADN de una variante de factor VIII con el dominio B deleciónado en el vector de tipo comercial pSI (promega). En este constructo fueron eliminados todos los catorce aminoácidos externos del dominio B del FVIII (SQ-Mutante, vgl. Lind y otros, Eur. J. Biochem., Bd. 232, 1995, páginas 19-27).

Inicialmente tuvo lugar una modificación del vector pF8-SQ#428, según la cual el vector fue cortado con EcoRV/Agel; y ligado del oligonucleótido P-A/Em(1) 5'-CCGGAGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAGAC-3' y P-A/Em (2) 5'-GTCTTCATAA CTGTCCTCGT AATAATCT-3'. Este proceso dio lugar al vector pF8-SQ-dA/E#501. Dentro de este vector se activa la expresión del FVIII-cADN con intermedio del promotor y mediador SV40. En sentido contrario a la corriente, en el extremo 3' del gen FVIII se utiliza el lugar de poliadenilación de SV40 para terminar la transcripción. Se introdujo un intron quimérico, reunido del lugar 5' cedente del primer intron de los genes  $\beta$ -globina humanos y de la ramificación y del lugar 3' aceptor del intron, que se encuentra entre el líder y el cuerpo de una región variable de una cadena larga de un gen de inmunoglobulina, para aumentar la magnitud de la expresión génica (ver pSI, información de producto, promega). Para aumentar adicionalmente las cantidades de expresión, se insertó un contexto de secuencia que se mostró óptimo para la iniciación de la traslación de la proteína eucariótica ("Kozak-Sequenz" 5'-GCCACCATG-3'), directamente en sentido contrario a la corriente del codón inicial de FVIII (Kozak, J. Biol. Chem., Bd. 266, 1991, páginas 19867-19870). El vector pF8-SQ-dA/E#501 fue utilizado entonces para la construcción de los vectores pC2-m7#516 y pC2-m9#518.

## ES 2 292 255 T3

La construcción de pC2-m7#516 tuvo lugar por inserción del oligonucleótido Mu(1)5'-CGAATT-CACC CCA GATTG GGAACACCAG ATTGCCCTGA GGCTGGAGAT TCTGGGCTGC GAGGCACAGC AGCA-GTACTG AGC-3' y P-Mu(2) 5'-GGCCGCTCAG TACTGCTGCT GTGCCTCGCA GCCCAGAATC TCCAGCCTCAGGG CAATCTG GTGTTCCCAA ATCTGGGGGT GAATT-3' en el vector cortado con AsuI/NotI pF8-SQ-dA/E#501.

El vector resultante codifica para una variante de factor VIII, que presenta las siguientes sustituciones: Ser<sup>2312</sup> hasta Ile<sup>2312</sup>, Val<sup>2314</sup> hasta Glu<sup>2314</sup>, Met<sup>2321</sup> hasta Leu<sup>2321</sup>, Val<sup>2323</sup> hasta Ile<sup>2323</sup>, Asp<sup>2330</sup> hasta Gln<sup>2330</sup> y Leu<sup>2331</sup> hasta Gln<sup>2331</sup>.

La construcción de pC2-m9#518 tuvo lugar por inserción del oligonucleótido P-CC(1) 5'-CTAG-AACCAC CGT TAGTGGC TCGCTACGTG CACTGCACC CCCAGAGTTG GGCTCACCAT-3', P-CC(2) 5'ATTGCC-CTGA GGCTGGAGGT TCTGGGCTGC GATACTCAGC AGCCAGCTTG AGC-3', P-CC(3) 5'-GGCCGCTCAA GC-TGGCTGCT GAGTATCGCA GC-3', P-CC(4) 5'-CCAGAACCTC CAGCCTCAGG GCAATATGGT GAGCCC AACT CTGGGGGTGC-3' y P-CC(5)5'-AGTCGCACGT AGCGAGCCAC TAACGGTGGT T-3' en el vector pF8-SQ-dA/E#501 cortado con XbaI/NotI.

El constructo pC2-m9#518 codifica para una variante de factor VIII que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: Asp<sup>2298</sup> hasta Glu<sup>2298</sup>, Leu<sup>2302</sup> hasta Val<sup>2302</sup>, Thr<sup>2303</sup> hasta Ala<sup>2303</sup> y Leu<sup>2306</sup> hasta Val<sup>2306</sup>, Ile<sup>2308</sup> hasta Leu<sup>2308</sup>, Val<sup>2314</sup> hasta Ala<sup>2314</sup>, Gln<sup>2316</sup> hasta His<sup>2316</sup>, Met<sup>2321</sup> hasta Leu<sup>2321</sup>, Glu<sup>2327</sup> hasta Asp<sup>2327</sup>, Ala<sup>2328</sup> hasta Thr<sup>2328</sup>, Asp<sup>2333</sup> hasta Gln<sup>2330</sup>, Leu<sup>2331</sup> hasta Pro<sup>2331</sup> y Tyr<sup>2332</sup> hasta Ala<sup>2332</sup>.

Ambos vectores, pC2-m9#518 y pC2-m7#516, que codifican para el factor VIII#518 o bien el factor VIII#516, fueron transfectados a células C127 de fibroblastos de ratón, de manera que se utilizó la precipitación con fosfato cálcico (J. Sambrook y otros, Molecular Cloning; A laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1989, páginas 1637). Los vectores fueron cotransfectados (relación 20:1), de manera que se utilizó el plásmido pDH#310, lo que posibilitó una selección de transfectantes con higromicina B (200 µg/ml).

Se cultivaron células C127, que expresan el factor VIII normal (ver ejemplo IV), factor VIII#518 y factor VIII#516 de manera estable, hasta 50% de confluencia en 4 cubetas de una placa con 24 placas (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca). Las cubetas fueron lavadas cinco veces con utilización de medio IMEM (Boehringer Ingelheim/BioWhitaker, Verviers, Bélgica), y se añadió 1 ml de medio IMEM. En dos de las cubetas para cada variante de factor VIII se añadió el antagonista RAP de LRP hasta una concentración de 20 mg/ml de manera inmediata y 2 h después del lavado de las células. Se sacaron muestras a las dos y las tres horas después del lavado de las células y posteriormente se analizó la actividad del cofactor del factor VIII con utilización de un procedimiento ya establecido (Mertens K. y otros, Brit. J. Haematol., Bd. 85, 1993, 133-142). En la tabla VII se han indicado las cantidades de expresión de factor VIII en presencia y ausencia de RAP en diferentes momentos de tiempo. Para el factor VIII normal, así como para las variantes de factor VIII #516 y #518, se observa un aumento de la actividad de factor VIII en el medio en presencia o en ausencia de RAP. No obstante, para el factor VIII normal aumenta la cantidad de expresión en presencia de RAP, siendo por lo contrario fuertemente reducido este efecto para las variantes del factor VIII #516 y #518 siempre que existan en absoluto. Esto muestra que la absorción celular indicada por LRP de las variantes de factor VIII #516 y #518 discurre con menor eficiencia que en el factor VIII normal. Por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos en el dominio C2 del factor VIII, tal como se ha mostrado para las variantes #516 y #518 del factor VIII, hacen el factor VIII menos sensible a una absorción celular indicada por LRP.

TABLA VII

*Cantidades de expresión de factor VIII normal y de las variantes de factor VIII #516 y #518 en presencia y en ausencia de RAP. Los datos representan el valor medio ± de dos investigaciones independientes*

Factor VIII	Tiempo (h)	Expresión (E/L)		Relación +RAP/-RAP
		-RAP	+RAP	
normal	2	1,3 ± 0,1	4,2 ± 0,4	3,2
	3	2,2 ± 0,2	5,0 ± 0,3	2,3
#516	2	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	1,0
	3	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,3	1,3
#518	2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,2
	3	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,3	1,1

## ES 2 292 255 T3

### REIVINDICACIONES

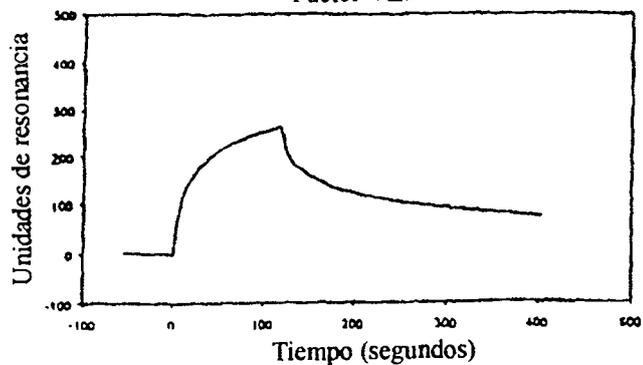
- 5 1. Polipéptido de factor VIII humano, que tiene actividad de factor VIII: C, que comprende una modificación entre AS 1743 (Phe) y 1749 (Arg), AS 1784 (Ser) y 1831 (Asp), AS 1888 (Ser) y 1919 (His), AS 1942 (Trp) y 1947 (Met), AS 1959 (Ser) y 1974 (Ala), AS 2037 (Ile) y 2062 (Trp), AS 2108 (Asp) y 2118 (Asn) y/o AS 2154 (Thr) y 2158 (Ile), de manera que la modificación es una mutación, delección o inserción que aumenta la afinidad de unión a la proteína, relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP).
- 10 2. Polipéptido de factor VIII, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la modificación está situada entre AS 2037 (Ile) y 2062 (Trp), AS 2108 (Asp) y 2118 (Asn) y/o AS 2154 (Thr) y 2158 (Ile).
3. Polipéptido de factor VIII, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la modificación se encuentra entre AS 2112 (Trp) y 2115 (Tyr).
- 15 4. Molécula de ADN que codifica un polipéptido de factor VIII, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene actividad de factor VIII:C.
5. Vector de expresión, que comprende una molécula de ADN, según la reivindicación 4.
- 20 6. Célula transformada y descendencia de la misma, que presenta una molécula de ADN, según la reivindicación 4, o un vector de expresión, según la reivindicación 5.
7. Procedimiento para la preparación de un polipéptido de factor VIII que tiene actividad de factor VIII:C, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las siguientes etapas:
- 25 - Cultivo de una célula huésped en un medio de cultivo, de manera que dicha célula huésped comprende un vector de expresión que en la dirección de transcripción contiene una región de regulación de transcripción y una región de inicio de traslación, que es eficaz en una célula huésped,
- 30 una secuencia de ADN, que codifica para un polipéptido, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 3, y
- 35 regiones de traslación y transcripción-terminación que son eficaces en dicha célula huésped, de manera que la expresión de dicha secuencia de ADN es regulada por dichas regiones de inicio y de terminación, y
- aislamiento del polipéptido.
8. Preparado, que comprende una molécula de FVIII, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene actividad FVIII:C y un polipéptido seleccionado del grupo de los antagonistas de LRP.
- 40 9. Preparado, según la reivindicación 8, en el que el antagonista de LRP es seleccionado del grupo de RAP y fragmentos solubles de LRP.
- 45 10. Preparado, según la reivindicación 8, en el que los fragmentos solubles de LRP muestran afinidad de unión al lugar de unión FVIII-LRP.
11. Utilización de un polipéptido de factor VIII, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de un preparado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para la formulación de un preparado para el tratamiento de un defecto de coagulación.
- 50 12. Utilización de un preparado, según la reivindicación 11, en el que el defecto de coagulación es hemofilia A.

55

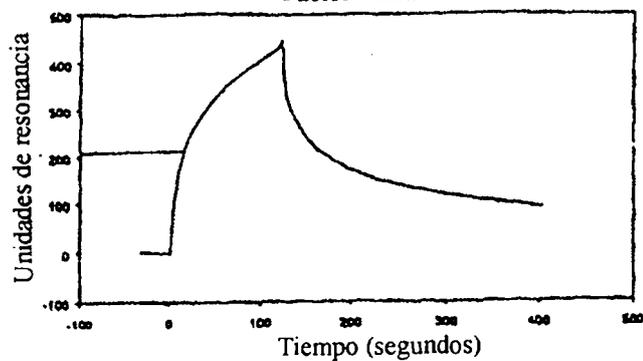
60

65

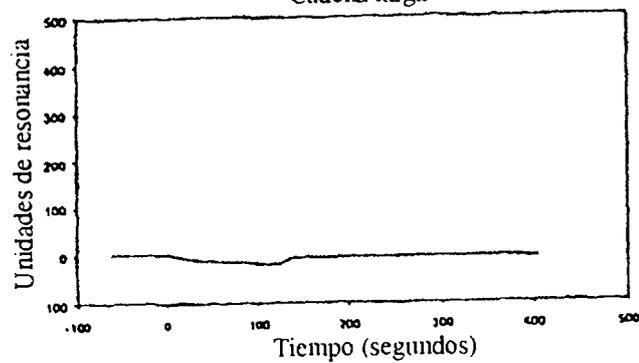
FIG. 1  
Factor VIII



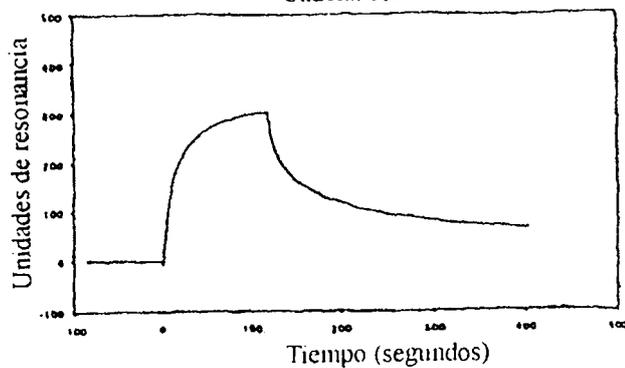
Factor VIIIa



Cadena larga



Cadena corta



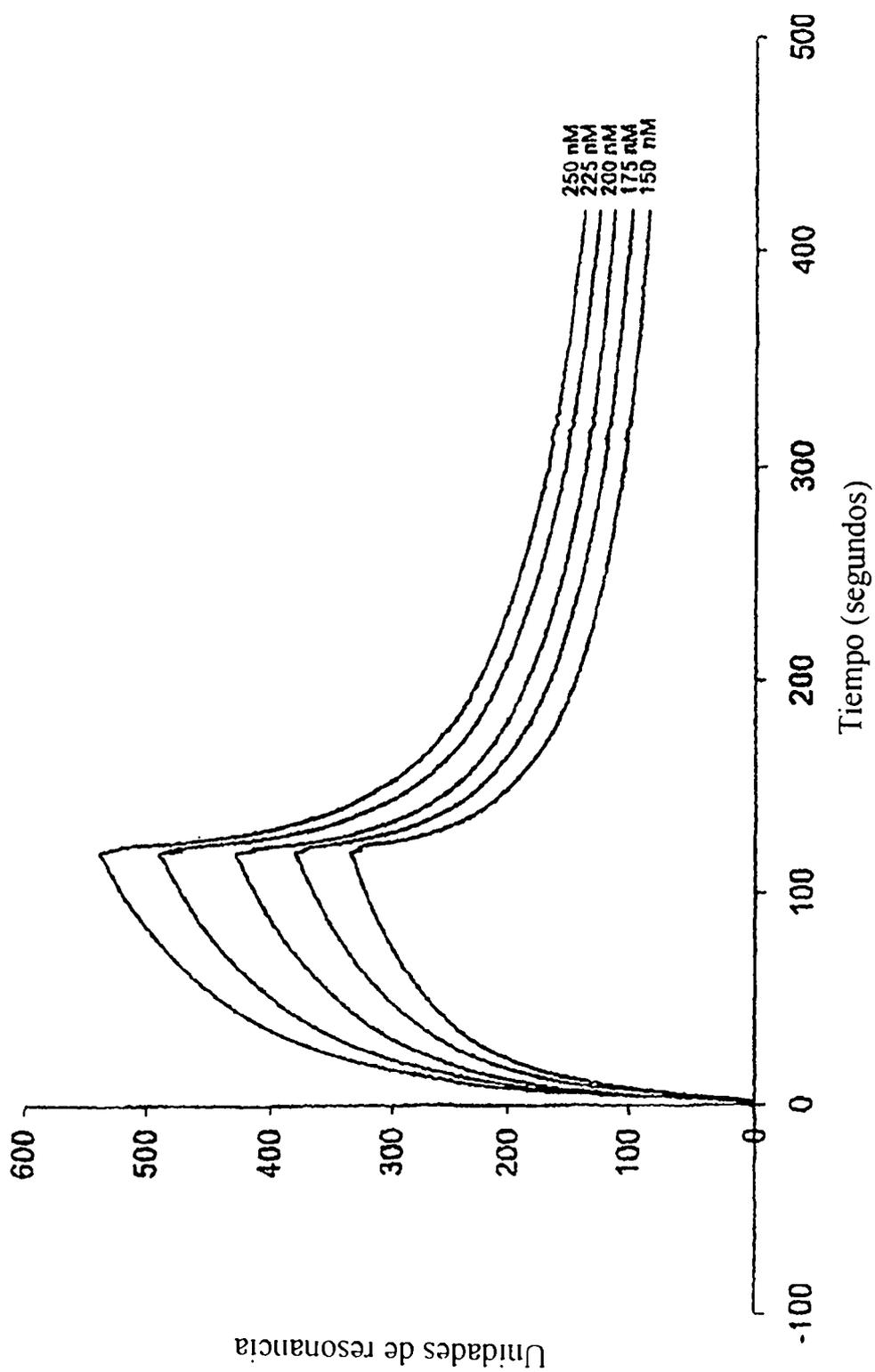


FIG 2

FIG. 3

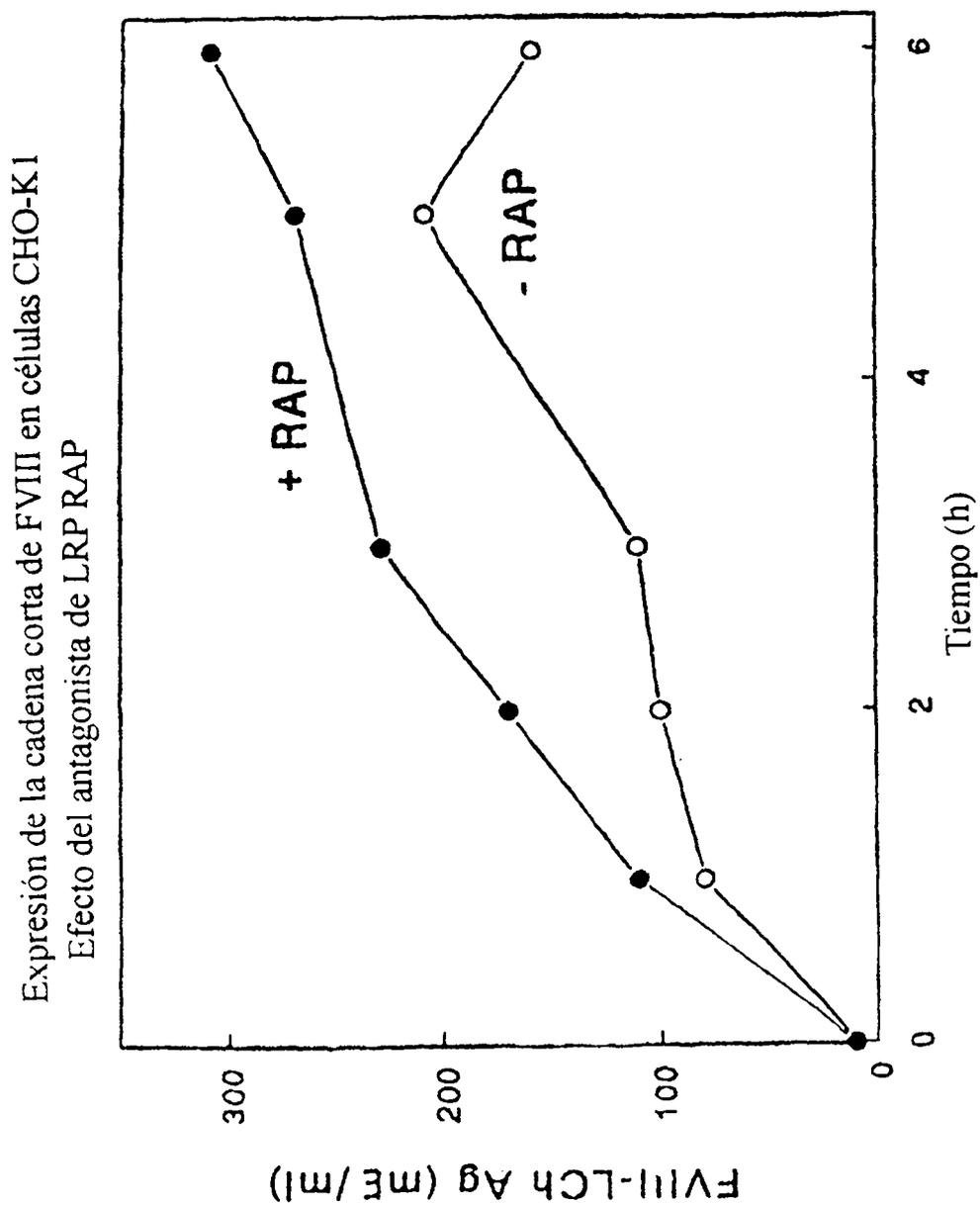


FIG. 4

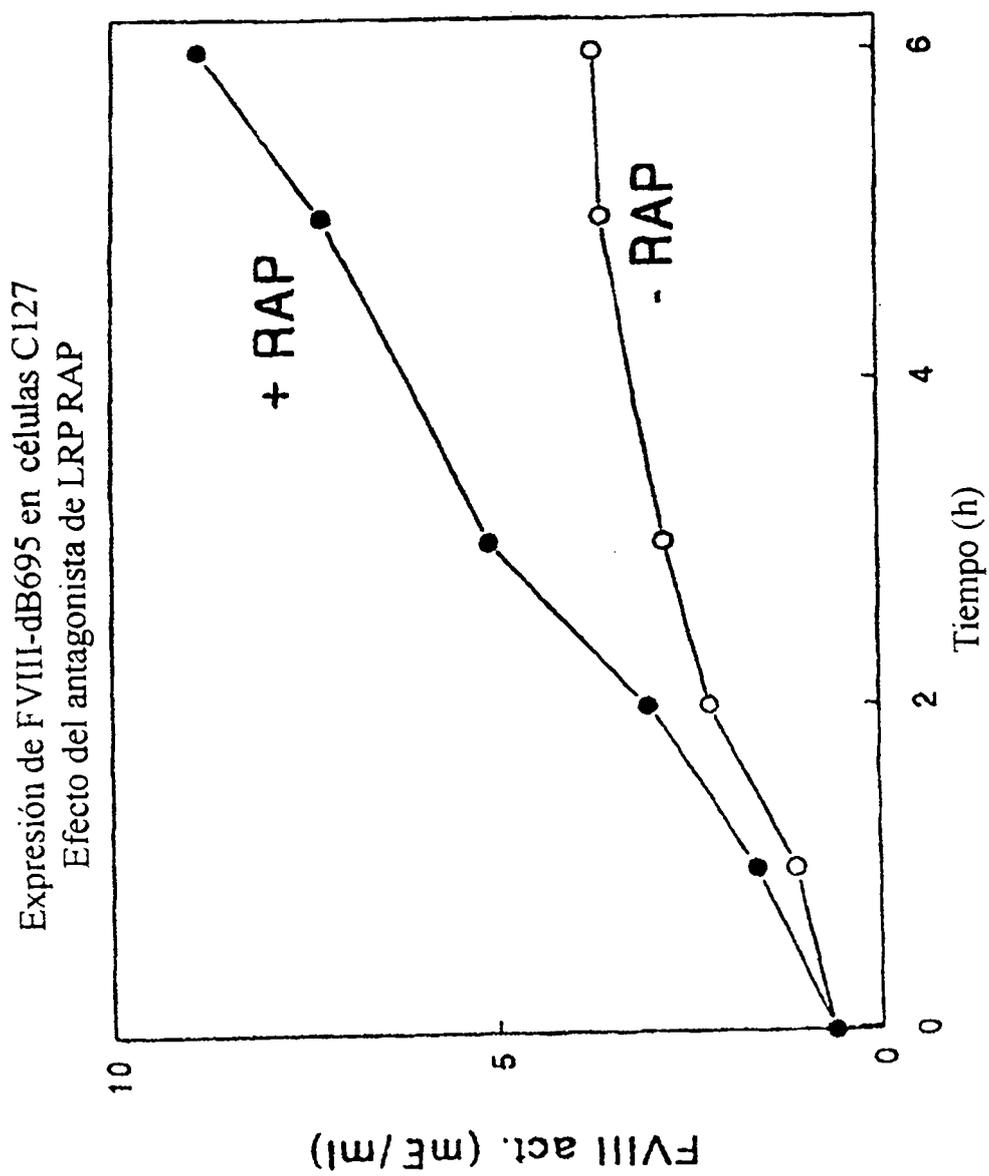


FIG. 5A

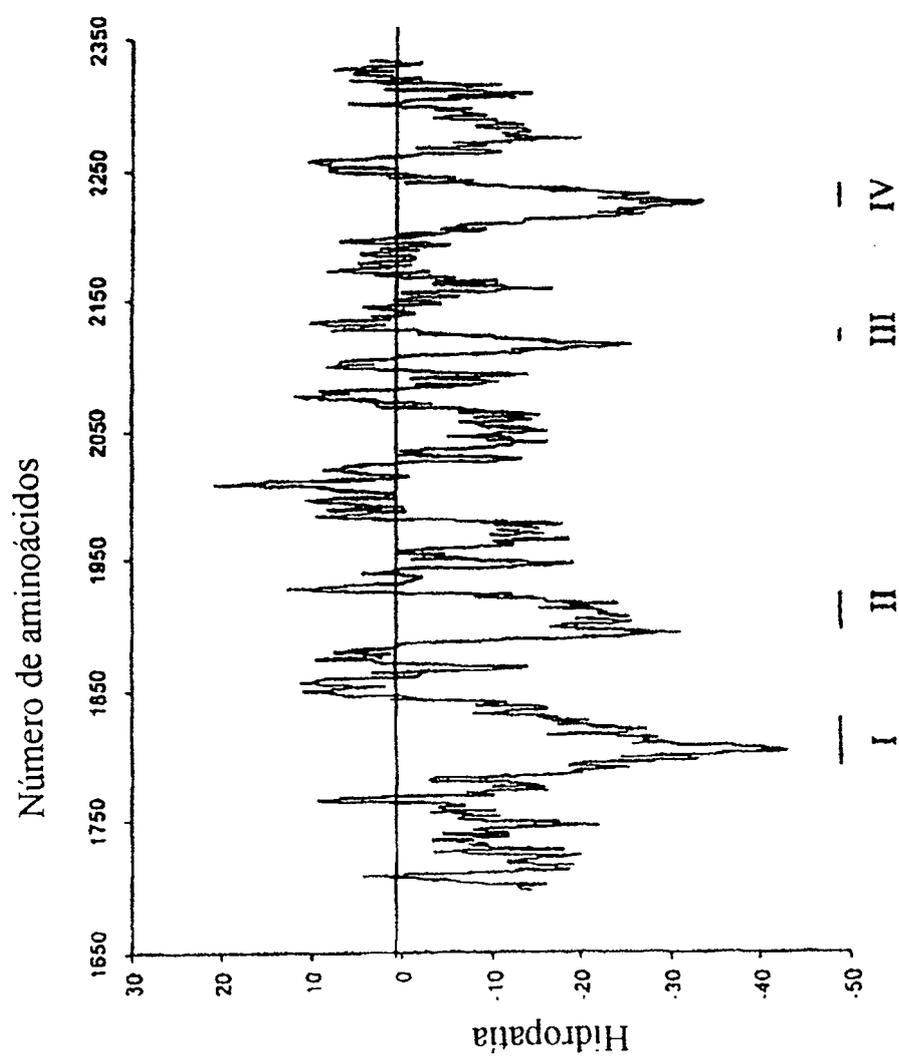


FIG. 5B

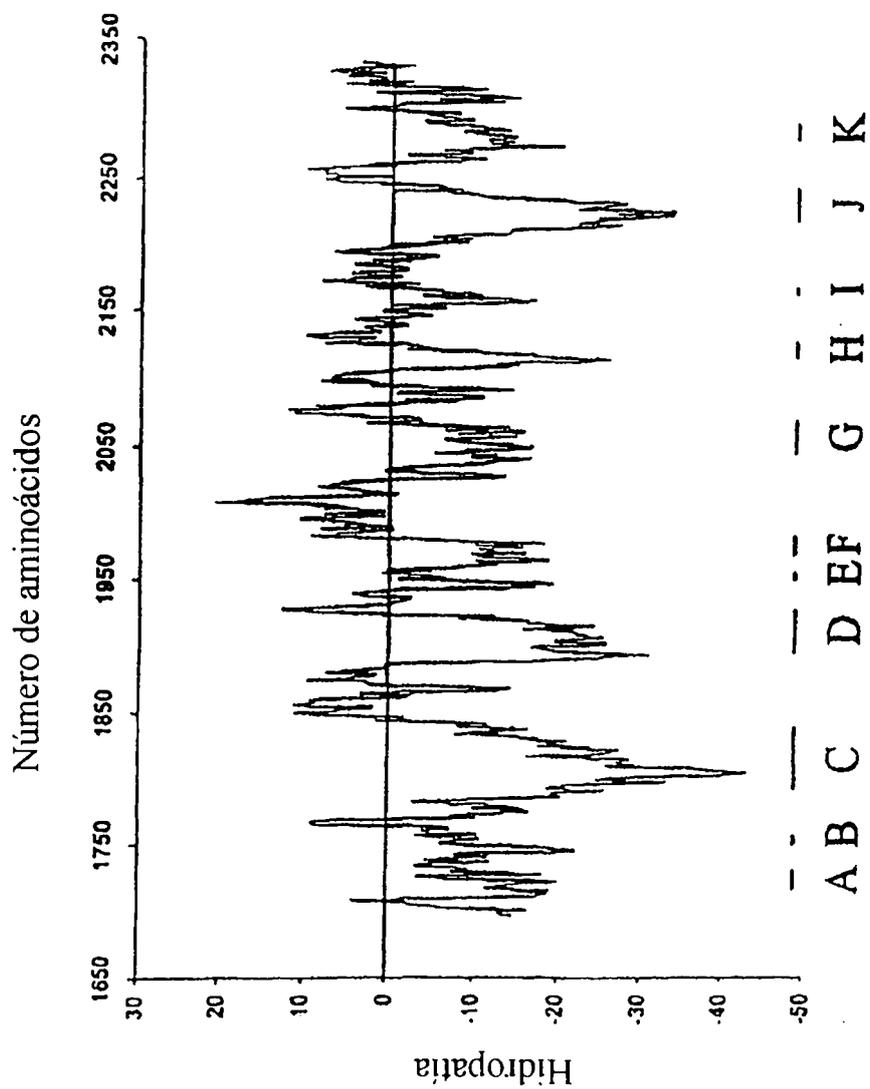
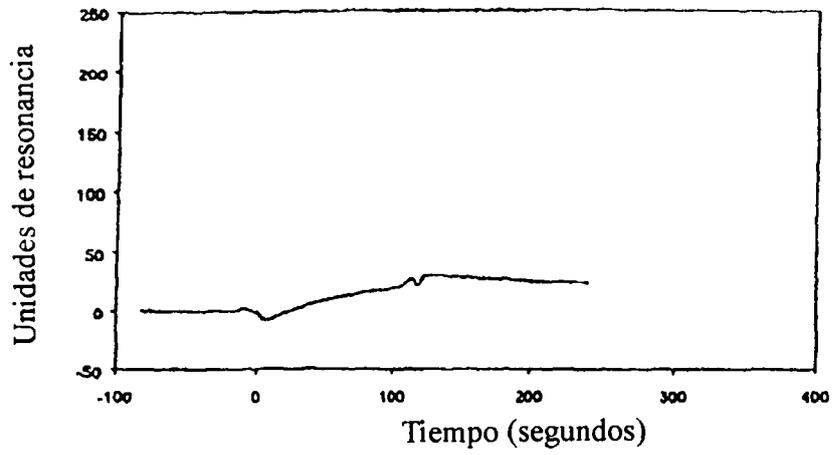
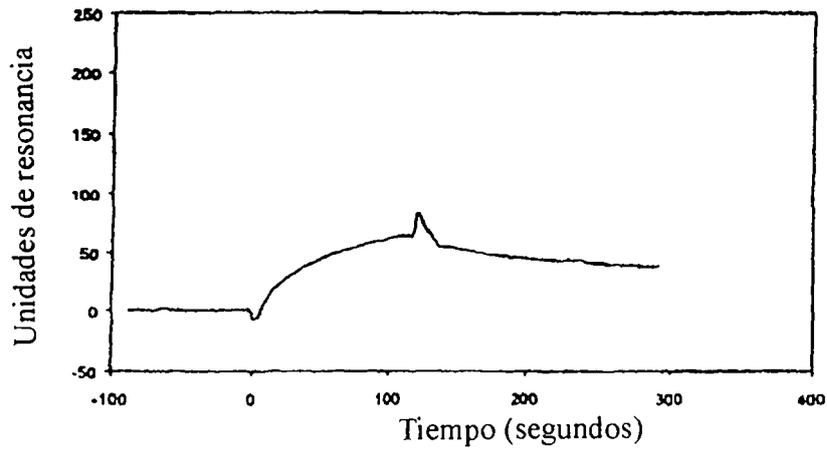


FIG. 6

500 nM ESH8



100 nM C2 + 500 nM ESH8



370 nM C2 + 500 nM ESH8

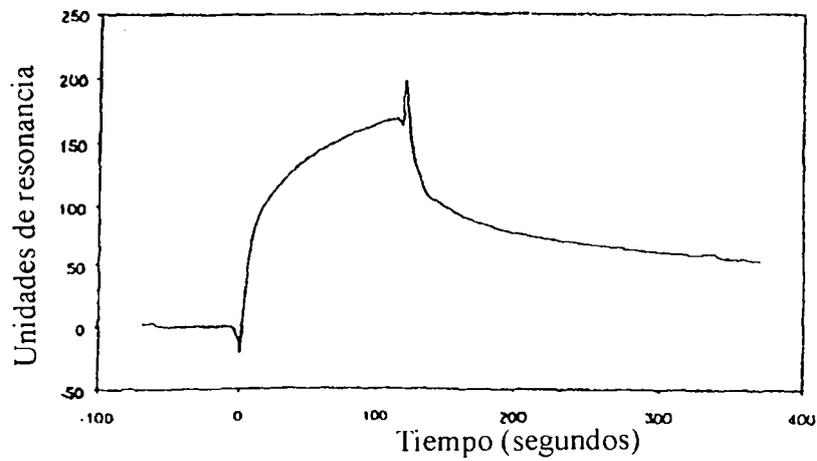


Fig. 7

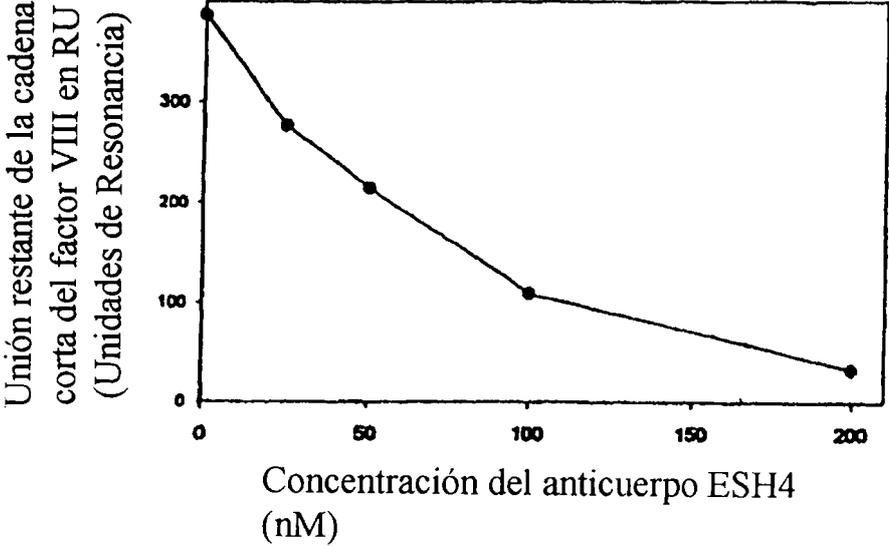
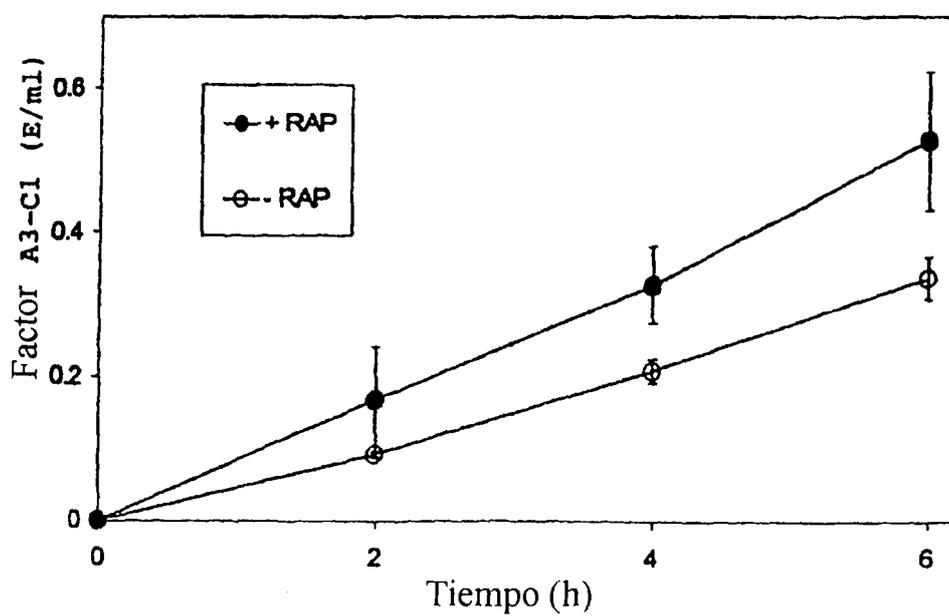


FIG.8

Expresión del factor VIII-A3-C1 en células CHO-K1  
Efecto del antagonista de LRP RAP



# ES 2 292 255 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Baxter AG
- 5 <120> Un polipéptido de factor VIII con actividad de factor VIII: C
- <130> R36089
- 10 <140> PCT/AT99/00272
- <141> 1999-11-10
- <150> A 1872/98
- 15 <151> 1998-11-10
- <160> 14
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 33
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
- <400> 1
- 35 ttaggatcca ccactatgca aatagagctc tcc 33
- <210> 2
- <211> 34
- 40 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
- <400> 2
- 50 agtagtacga gttattcac taaagcagaa tcgc 34
- <210> 3
- <211> 35
- 55 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
- <400> 3
- 65 ttgcgattct gctttagtga aataactcgt actac 35

## ES 2 292 255 T3

<210> 4  
<211> 32  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
10  
<400> 4  
attgcgccg ctcagtagag gtcctgtgcc tc 32

15  
<210> 5  
<211> 33  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
25  
<400> 5  
aatgcgccg ctcaattta aatcacagcc cat 33

30  
<210> 6  
<211> 32  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido  
40  
<400> 6  
cggagatta ttacaggac agttatgaag ac 32

45  
<210> 7  
<211> 28  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido  
55  
<400> 7  
gtctcataa ctgtcctcgt aataatct 28

60  
<210> 8  
<211> 83  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 292 255 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

5 <400> 8  
cgaattcacc cccagatttg ggaacaccag attgccctga ggctggagat  
tctgggctgc 60  
10 gaggcacagc agcagtactg agc 83

<210> 9  
<211> 85  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 9  
ggccgctcag tactgctgct gtgcctcgca gcccaagaatc tccagcctca  
25 gggcaatctg 60  
gtgttcccaa atctgggggt gaatt 85

<210> 10  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

40 <400> 10  
ctagaaccac cgttagtggc tcgctacgtg cgactgcacc cccagagttg  
ggctcaccat 60

45 <210> 11  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55 <400> 11  
attgccctga ggctggaggt tctgggctgc gatactcagc agccagcttg  
agc 53

60 <210> 12  
<211> 32  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 292 255 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 12

5	ggccgctcaa gctggctgct gatatcgca gc	32
---	------------------------------------	----

<210> 13

10 <211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 13

20	ccagaacctc	cagcctcagg	gcaatatggc	gagcccaact
	ctgggggtgc		50	

<210> 14

25 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

35 <400> 14

	agtcgcacgt agcgagccac taacggtggt t	31
--	------------------------------------	----

40

45

50

55

60

65