



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 033**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 15/67** (2006.01)  
**C07K 14/755** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00104677 .0**  
86 Fecha de presentación : **03.03.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1048726**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2000**

54 Título: **cADN modificado de Factor VIII.**

30 Prioridad: **17.03.1999 EP 99104050**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2007**

73 Titular/es: **Claude Négrier**  
**Hopital Edouard Herriot Centre Regional de**  
**Traitement de l'Hemophilie place D'**  
**69437 Lyon Cédex 03, FR**

72 Inventor/es: **Négrier, Claude y**  
**Plantier, Jean Luc**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 269 033 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

cADN modificado de Factor VIII.

5 Esta invención está dirigida a un cADN modificado de Factor VIII y su uso en la mejora de la producción del Factor VIII.

10 El Factor VIII (FVIII) es un cofactor de coagulación de plasma implicado en la activación del factor X (FX). Una disminución en la presencia o actividad del Factor VIII en el torrente sanguíneo conduce a la hemofilia A. El nivel de la disminución en la actividad del Factor VIII es directamente proporcional a la severidad de la enfermedad (Foster and T. S., 1989; Kaufman, 1992; Vlot *et al.*, 1998). El tratamiento habitual de la hemofilia A consiste del reemplazo de la proteína faltante mediante FVIII derivado de plasma o recombinante. El FVIII recombinante es producido en células CHO o BHK después de la selección de los mejores clones de producción y la amplificación del número de copia cADN del FVIII.

15 Varios estudios han enfatizado el bajo nivel de producción de fVIII en diferentes sistemas celulares: La Biosíntesis de FVIII ha mostrado estar regulado en al menos tres diferentes niveles. Primero, entre la secuencia cADN del FVIII dos tramos de nucleótidos, localizados en el dominio codificante A2, demostraron que actuaban, como silenciadores transcripcionales (Fallaux *et al.*, 1996; Hoeben *et al.*, 1995; Koebel *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1993). Segundo, en la síntesis de proteína FVIII es estrechamente regulada por varios chaperones del retículo endoplasmático (Bip; Calreticulina; Caknexina; ERGIC-53). Muchas de éstas interacciones retienen FVIII en la célula y la dirigen a través de la maquinaria de degradación celular (Corner *et al.*, 1987; Nichols *et al.*, 1998; Pipe *et al.*, 1998). Tercero, una vez secretado el FVIII es sensible a la degradación por proteasa y necesita ser protegido por el Factor von Willebrand (vWF) (Kaufman *et al.*, 1989).

25 El documento WO 92 16557 describe la expresión del FVIII humano recombinante ausente de dominio B biológicamente activo en células de ovario de hámster Chino después de traducción de gen mediado por vector.

30 El documento WO 94 29471 describe un vector adenoviral que expresa FVIII o FIX y en donde dicho vector incluye además al menos un elemento genómico. El vector se puede utilizar para terapia de gen para suministrar factores de taponamiento tales como FVIII o FVIX para el tratamiento de la hemofilia. Sin embargo, el uso de esta invención es especialmente difícil con FVIII.

35 El documento Lind *et al.*, 1995 describe la producción de moléculas recombinantes similares a la molécula FVIII derivada de plasma activa más pequeña, un complejo de una cadena de polipéptido de 80 kDa y 90 kDa a la que le falta el dominio B producida utilizando varias construcciones cADN de FVIII con el fin de obtener productos de traducción primario que fueran eficientemente procesados en el complejo 80 + 90 kDa. Sin embargo, este FVIII no presenta ventajas particulares sobre los rendimientos de expresión FVIII. El documento Karachi *et al.*, 1995 describe el efecto positivo respectivamente grandemente truncado intrón I sobre la expresión del Factor IX. Sin embargo, la inserción de tal intrón en el FIX no indica ninguna utilización en el FVIII. Los inventores ya han trabajado en la expresión de FVIII, como se ilustra en el documento EP 1 038 959.

45 Es por lo tanto un problema desarrollar procesos mejorados que den como resultado mayores rendimientos de FVIII. La presente invención ofrece una solución a este problema mediante un cADN de FVIII modificado.

De acuerdo con esta invención se hace disponible un cADN de FVIII modificado en el cual el dominio B del cADN tipo silvestre del FVIII ha sido suprimido y se ha insertado un intrón I de FIX truncado en una o más localizaciones del cADN de FVIII.

50 Además el dominio B del cADN silvestre de FVIII ha sido reemplazado por cuatro argininas.

Estas construcciones FVIII fueron preparadas como sigue:

#### 1. Clonación de FVIII

55 Se diseñó una estrategia de clonación PCR con base en la síntesis de cuatro fragmentos PCR, que extienden el cADN de FVIII y exceptuando el dominio B. Con base en los datos publicados, fue de interés reemplazar el dominio B por cuatro argininas. Utilizando la transcriptasa inversa MoMuLV (Promega, Carbonieres, France) fue hecha una transcripción inversa sobre un ARN de célula humana aislado de una biopsia de hígado con el consentimiento informado por escrito del paciente. Cuatro fragmentos PCR fueron generados utilizando el expand System (Boehringer-Mannheim, Alemania), como se describe en la Tabla 1.

65

# ES 2 269 033 T3

TABLA 1

*Resumen de fragmentos PCR VIII*

Fragmento	Oligonucleótido sentido contra sentido	SEQ ID NO.	Tamaño en bp	Sitio de clonación 5'	Sitio de clonación 3'
1	FVIII ATG 3' Bgl II	No. 1 No. 2	1704	Not I	Bgl II
2	5' Bgl II 4R AS	No. 3 No. 4	624	Bgl II	Sal I
3	4R S 3' Bgl I	No. 5 No. 6	1093	Sal I	Bgl I
4	5' Bgl I FVIII stop	No. 7 No. 8	1026	Bgl I	Xho I

Todas las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para clonar son mostradas en el anexo 1.

Una mejora adicional se desarrollo mediante la optimización del ambiente ATG siguiendo las reglas de Kozak (Kozak, 1997). Para este propósito se utilizó el ATG de FVIII de oligonucleótido (SEQ ID No. 1).

*Comparación de las secuencias de ATG de FVIII tipo silvestre y ATG de FVIII modificado Kosak*

Secuencia WT: TAA GTC ATG CAA ATA

Kosak modificado: ACA CCC ATG GAA ATA

Los amino ácidos modificados se representan en resaltado.

Cuatro argininas reemplazan de acuerdo con la invención el dominio de la proteína FVIII. Ellas se introducen mediante los oligonucleótidos utilizados para clonación de los dos fragmentos que circulan el dominio B (ver fragmentos 2 y 3 de la Tabla 1), a saber los oligonucleótidos 4R AS (SEQ ID No. 4) y 4R (SEQ ID No. 5). El sitio Sal I se generó mediante la secuencia de codificación de las argininas como sigue:

## SITIO SAL I

4RS: 5'- A AGA CGT CGA CGA GAA ATA ACT CGT ATC ACT CTT

4R AS TTG TTA CGG TAA CTT GGT TCT TCT GCA GCT GCT CTT

## SECUENCIA PEPTÍDICA CORRESPONDIENTE:

Pro Arg Arg Arg Arg Glu LLe Thr Arg Thr Thr Leu en el FVIII tipo silvestre la secuencia peptídica de:

Pro – Arg – Dominio B- Arg – Glu.

Esto indica que el sitio de restricción Sal I se insertó a través de la secuencia de codificación en la cuarta arginina sin ninguna alteración de la secuencia. Todos los fermentos PCR fueron clonados en un vector pCR2 utilizando un kit de clonación t/a (In Vitrogen, de Holanda). Dos claves de cada fragmento fueron completamente secuenciados. Se encontraron algunas mutaciones en una proporción de 1 por 800 bases. Una mutación permaneció silenciosa pero las tres otras modificaron la secuencia de codificación y las tres piezas de cADN que llevan las mutaciones fueron sucesivamente intercambiadas.

Una estrategia de sub clonación subsecuente conduce a la producción de dos fragmentos (siendo cada uno la suma de dos productos PCR): un 5' 2.3 kb (FVIII ATG) y un 3' 2.1 kb (FVIII Tope). El 5' 2.3 kb (FVIII ATG) y el 3' 2.1 kb (FVIII Tope) fueron construidos e insertados en el vector de expresión pCDNA3 (In Vitrogen, Holanda) abierto por el Not I y Xho I y tratado con fosfatasa alcalina. El casete de clonación de pCADN3 representa una secuencia de restricción similar al pCR2 y el vector posee su propio gen de resistencia (NEOMICINA). Un cADN que codifica el

## ES 2 269 033 T3

FVIII con el dominio B suprimido denominado posteriormente cADN de Factor FVIII) ya fue obtenido en el vector de expresión. La integridad del cADN del FVIII final se revisó mediante análisis de restricción extensivo.

5 El cADN de Factor VIII fue subclonado en el Bluescript Pks II + vector abierto por Not I y Xho I. El uso de este detector fue más conveniente para la introducción de las modificaciones subsecuentes en el cADN del Factor VIII (por ejemplo adición de intrones; ver posteriormente).

### 2. Inserción del Intrón 1 FIX truncado

10 De acuerdo con la invención de cADN del FVIII fue modificado adicionalmente mediante la inserción del intrón I truncado del Factor IV (FIX T1 = SEQ ID NO 9). El FIX T11 se insertó en diferentes sitios del cADN del FVIII como sigue:

- En el sitio del intrón 1 del FVIII, para utilizar estrategia similar como para el FIX (Karachi *et al.*, 1995).

15 - En el intrón FVIII 12 y 13 sitios, en razón a que se describió en esta región una secuencia silenciadora transcripcional.

20 - En los sitios 1 +12 y 1 +13 de los intrones FVIII. En razón a que el cADN del FVIII es mucho mayor que el FIX, 4.4 kb BS 1.4 kb, se tuvo la hipótesis de que podría ser de interés introducir secuencias supuestamente estabilizantes en los sitios normalmente ocupados por los intrones 12 y 13 además del intrón 1. En razón a que la localización de los intrones 12 y 13 esta aproximadamente en la mitad de la secuencia del FVIII es posible que ellos puedan actuar sinérgicamente con el intrón 1.

25 La secuencia del FIX T11 (=SEQ ID NO 9) utilizada de acuerdo con la invención en diferentes sitios del cADN del FVIII inicia después de la secuencia codificante mediante la secuencia donadora de empalme y termina por la secuencia aceptadora de empalme del intrón 1 truncado. Las letras mayúsculas inician después del tope antes de los sitios de restricción Nsi I y Mlu I, respectivamente. Para detalles ver anexo 2.

30 Para clonar este fragmento en una secuencia hexógena, dos nuevos fragmentos de unión FVIII fueron generados, uno corriente arriba del FIX T11 con la adición de un sitio Nsi y uno corriente abajo con la adición del sitio Mlu I. Los tres fragmentos fueron subsecuentemente ligados juntos utilizando estos sitios.

35 Una estrategia similar se utilizó para insertar los tres FIX T11 en diferentes sitios. En cada caso tres fragmentos PCR (A, B, C) fueron generados con el Expand System utilizando el cADN de Factor VIII como molde para los segmentos A y C, un Antón 1 del Factor IX para el fragmento B. Las extremidades del fragmento A comprenden la secuencia del Factor VIII en el extremo 5', y en el extremo 3' una fusión entre la secuencia de empalme 3' del FVIII y la secuencia de empalme 5' del primer intrón del Factor 9. Un sitio de restricción Nsi se agregó entre estas dos secuencias. El fragmento B posee en la extremidad 5' una secuencia complementaria al fragmento previo. El intrón 1 del Factor IX truncado y en el extremo 3' un sitio de restricción MluI insertado. El Fragmento C se hizo de la secuencia complementaria de la extremidad 3' del Fragmento B seguido por la secuencia de empalme 3' del primer intrón del factor 9 y mediante La secuencia de codificación corriente abajo del cADN del Factor VIII (ver Figura 1).

45 El fragmento B fue el mismo para todas las construcciones mientras que el A y el C fueron todos diferentes, correspondiéndole a las secuencias FVIII 5' y 3' de los sitios de inserción del intrón.

Las estrategias de inserción para las posiciones 12 y 13 del intrón se indican en la figura 2.

50 Cada uno de los fragmentos PCR fue generado y clonado primero en el vector PCR2 utilizando un kit de clonación T/A (invitrogen, Holanda). Ellos fueron ligados juntos en dos etapas sucesivas (pCR2-B+C/MluI+XhoI;pCR2-A+BC/NsiI+XbaI). Todos los fragmentos ABC (1, 12 y 13) fueron secuenciados y se muestran para estar libre de mutaciones.

TABLA II

55 *Resumen de los fragmentos PCR requeridos para introducir TFIX11*

Nombre del fragmento	Tamaño en bp
I1-A	204
TFIX11 (B)	281
I1-C	464
I12-A	234

## ES 2 269 033 T3

TABLA II (continuación)

	Nombre del fragmento	Tamaño en bp
5	I12-C	388
	I13-A	434
10	I13-C	180

El ABC1 fue clonado en PKSII + FVIII después de la digestión Spe I-Spe. Después de revisar la orientación, el cADN de FVIII I1 resultante se subclonó en el vector pCADN3 utilizando una digestión Not I-Xho. El ABC12 y el ABC13 fueron digeridos mediante Bgl II y Sal I y ligados en pKSII-FVIII digerido por las mismas enzimas. El FVIII I12 y el FVIII I13 resultantes fueron subclonados en pCADN3 utilizando una restricción Not I-Xho I.

Para generar una construcción que contiene dos intrones, el pKS FVIII I1 y los fragmentos ABC12 y ABC13 fueron digeridos por Bgl II y Sal I y ligados juntos. El pKSII FVIII I1+12 y el FVIII I1+13 fueron obtenidos y el cADN del FVIII que contiene los intrones fueron subclonados en pCADN3 mediante la misma estrategia que se describió previamente.

### 3. Generación de líneas celulares FVIII que se expresan establemente

Todas las construcciones pCADN3-FVIII fueron transfectadas en células CHO mediante electroporación. En resumen,  $7 \times 10^6$  células CHO lavadas fueron electroporadas en la presencia de 10 g de una construcción linearizada Pvu I. las células fueron seleccionadas 15 horas después de la electroporación en IMDM (=Medio de Dulbecco Modificado de Escobe) suplementado mediante antibióticos y 10% de suero de becerro fetal que contiene 0.6 mg/ml de G418. Para cada construcción (FVIII; I1; I12; I13; I1+12; I1+13), dos grupos de clones que contienen mas de 50 colonias individuales se hizo crecer y se congelo. Un conjunto de 25 colonias individuales fueron recogidas, crecida y evaluada para la expresión del factor 8 utilizando un método ELISA (Asserachrom VIII.C.Ag, Diagnostica STAGO, Asnières, France). Para todos los clones, la eficiencia de la transfección fue alrededor de 40-60% determinada por el número de clones de expresión. Los cinco mejores clones productores FVIII fueron mantenidos y congelados. El antígeno FVIII detectado vario dramáticamente de una construcción a la otra.

La actividad del Factor VIII recombinante fue medida utilizando el ensayo de taponamiento de una etapa clásico para cada uno de los grupos de los cinco clones seleccionados. Se encontró una actividad coagulante en cada uno de los supernadantes de las células que expresan Factor VIII que indica que la construcción fue codificante para una proteína funcional. La actividad estaba correlacionada con la cantidad de proteína detectada por ELISA. Por lo tanto, se demostró que a cada construcción se le permitió la producción de un FVIII pre coagulante funcional.

### 4. Evaluación de la eficiencia de la construcción

#### 4.1 Análisis cuantitativo en las células CHO

La cinética de la producción de FVIII se analizó para cada uno de los grupos de células CHO transfectadas. Para cada grupo, se hicieron experimentos independientes mediante dos diferentes experimentadores. En el día 0.4.10<sup>5</sup> células fueron sembradas en una placa de 6 pozos en 2 ml de medio fresco que contiene 0.6 mg/ml de G418. Desde el día 1 al día 4, se recolectó el supernadante del cultivo, se centrifugó y se ensayó para actividad de antígeno FVIII y pre-coagulante. Cada día, después de la remoción del medio, las células fueron tripsinizadas y contadas en Trypan Blue. La acumulación de FVIII demuestra en la figura 3. A tres construcciones se les permitió una mejor producción que al cADN de FVIII no modificado, es decir, FVIII I1, FVIII I1+12 y particularmente FVIII I1+13. el FVIII I1, FVIII I1+12 condujeron a 2 a 3 veces mayor producción y el FVIII I1+13 a 8 a 9 veces mas. Las actividades pre coagulantes se midieron de los mismos supernadantes y están presentes en la figura 4. Ellos están directamente correlacionados con la cantidad de antígeno detectada.

#### 4.2 Análisis cuantitativo en las células HepG2

Para confirmar los datos obtenidos en las células CHO se escogió un segundo modelo celular. Las construcciones que exhibían una mejora en la expresión de FVIII fueron ensayadas (por ejemplo FVIII, FVIII I1, FVIII I1+12; FVIII I1+13) utilizando la línea celular hepática transitoriamente transfectada HepG2. 2 g del ADN circular se agregaron a 12 l de reactivo de transfección de Fugeno 6 (Boehringer Mannheim, Meylan, France). Después de 15 minutos, el complejo se agregó gota a gota sobre un plato de 90 mm sembrado con  $5 \times 10^6$  células el día anterior. En la mezcla de transfección se incubó durante 6 h antes de ser remplazada por 4 ml de medio fresco. El medio de cultivo se recolectó 72 h después y se sometió a coagulación y a ensayos ELISA. Como se muestra en la figura 5, se obtuvo resultados utilizando células HepG2 confirmando los datos obtenidos en las células CHO con la excepción de la construcción FVIII y I1+12 que aquí no produjo ningún antígeno FVIII detectable. Estos datos reforzaron el interés potencial en la construcción FVIII I1+13.

## ES 2 269 033 T3

### 5. Análisis de los niveles de expresión

El ARN total de cada grupo transfectado se extrajo con un mini kit Rneasy (Quiagen), 6 x 10<sup>6</sup> células siendo utilizadas para cada extracción. 10 g del ARN total fue migrado a 120 V, 4 C e 0.8% de gel de agarosa en amortiguador de fosfato, transferido durante toda la noche sobre una membrana Hybond-N Nylon (Amersham) y horneados a 80 C por 2 h. Una sonda de ARN de FVIII, que contiene 1.03 Kb del fragmento Sal-Bgl fue generado mediante polimerasa T7 utilizando el Kit demarcado ARN DIG (Boehringer). La membrana se bloqueo 30 minutos mediante la solución DIG easy Hyb (Boehringer) y se incubo en la misma solución fresca durante toda la noche con 500 ng de una sonda antisentido marcada. Los lavados fueron conducidos según lo recomendó el fabricante y el blot fue revelado utilizando un kit de detección de DIG (Boehringer) analizado y cuantificado. Las señales de FVIII fueron comparadas con el ARN marcado BET ribosomal y la señal GAPDH.

Las cantidades de mRNA de FVIII, FVIII I1 y FVIII I+12 fueron muy cercanas una de la otra. El mRNA de FVIII I+13 se expreso en mayores cantidades. Estos resultados indican una correlación entre la cantidad de mRNA de la proteína producida para las construcciones. (Ver figura 6).

Un incremento de dos veces del mRNA del FVIII I1+13 condujo a 8 a 9 veces el incremento de la proteína. Por lo tanto, la adición del intrón I FIX truncado juega un papel doble en la estabilización del mRNA del FVIII pero también probablemente para actuar durante la traducción.

El mRNA del FVIII es de 4.4 kb de largo y las diferencias de 0.3 kb debido a un posible no empalme del TFIX11 puede no ser visible en el Northern blot. Un conjunto de experimentos A RT-PCR fue hecho sobre el ARN total extraído de diferentes líneas de célula. En cada caso una banda que corresponde al mRNA empalmado se obtuvo indicando el empalme del TFIX11 del mRNA de FVIII.

### 6. Caracterización de la proteína

Un anticuerpo anti-FVIII de oveja Cedarlane (Hornby, Canadá) fue comprada y ensayada positivamente en prueba inmunoblot usando recombinante FVIII. Este anticuerpo se utilizo en inmunoblot sobre súper nadante de célula pero no se obtuvo ninguna señal debido a la baja cantidad de antígeno secretada. Una inmunoprecipitación se hizo sobre el supernadante de célula pero aquí no se obtuvo de nuevo ninguna señal que indique la incapacidad de este anticuerpo a inmunoprecipitar FVIII. Se hizo un inmunoblot a lisados de células soluble Triton-X100. Plasmas de 90 mm se lisaron con amortiguador de Lisis enfriado con hielo 300 I (Hepes 20 mM pH 7.5, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Triton X-100 0.5%). Las células fueron peladas y centrifugadas a 4 C, 10 min a 14000 g, la concentración de proteína se midió con el kit de ensayo Dc-proteína (Bio Rad, Hercules, USA). 175 g de cada uno de los lisados de célula fue cargado sobre 7.5% de gel de acrilamida y tratado luego con el protocolo Laemmli. Después de transferencia semiseca (35 min a 400 mA), se incubo la membrana de nitrocelulosa durante toda la noche en TBS-T (20 mM Tris pH 7.5 NaCl 0.15 M, Tween-20 0.5%). La membrana fue entonces incubada 1 h con el anticuerpo anti-FVIII (5 g/ml) en TBS-T. Después de tres lavados de 10 min cada uno en TBS-T, se incubo la membrana durante 30 min con anticuerpo acoplado a peroxidasa anti oveja de conejo (dilución 10<sup>-4</sup> en TBS-T). Se condujeron lavados extensivos antes de la revelación con el sistema ECL (Amersham).

Entre todos los lisados, solamente las células transfectadas con la construcción FVIII I+13 dio una señal positiva con un peso molecular aproximado correcto. El FVIII I+13 apareció como un producto de banda simple que emigra a un peso molecular que corresponde a la cadena pesada del Factor VIII desprovisto del dominio B.

Con el fin de confirmar las diferencias observadas en las cantidades FVIII intracelulares, fue hecho un ELISA sobre lisados solubles Triton X-100. La presencia de Triton X-100 mostró que no influencia el ensayo ELISA de FVIII. El valor del antígeno FVIII presente dentro de las células confirma los datos obtenidos en el Western blot.

El FVIII I+13 condujo a una síntesis 100 veces mayor del antígeno que todas las otras construcciones (29 ng/ml vs 0.3 ng/ml para FVIII) (ver figura 7).

El objeto de la invención son, por lo tanto las construcciones con supresión del dominio B del FVIII que contienen un intrón I truncado con factor IX ligeramente modificado en diferentes sitios del cADN. Entre estas construcciones un cADN que lleva un intrón t truncado en ambos el intrón 1 del FVIII y los sitios del intron<sup>13</sup> condujeron a una producción intracelular 100 veces mayor que las otras construcciones y a secreción de proteínas 9 veces mayor. Esta producción y secreción mejorada se observó en dos diferentes líneas celulares: células CHO y HepG2. El FVIII producido fue completamente activo sobre un ensayo de taponamiento de una etapa y parece homogéneo sobre el inmunoblot. La cantidad de mRNA de todas las construcciones ensayadas difiere no más de tres veces indicando que el beneficio observado en la producción viene de un efecto transcripcional y uno transduccional.

La presente invención indica que la producción de FVIII se puede mejorar al agregar los intrones en el cADN del FVIII. Las ventajas de tales cADN de FVIII modificado para la producción de FVIII *in vitro* así como también la terapia de gen humana mediante la inserción de tal cADN en un transvector adecuado son importantes para el tratamiento futura de la hemofilia A.

## Bibliografia

**Domer, A.J., Bole, D.G., and Kaufman, R.J. (1987):** The relationship of N-Linked Glycosylation and Heavy Chain binding Protein Association with the Secretion of Glycoproteins. *J. Cell, Biol.* **105**, 2665-2674.

**Fallaux, F.J., Hoeben, R.C., Cramer, S.J., van den Wollenberg, D.J., Briet, E., van Ormondt, H., and van der Eb, A.J. (1996):** The human clotting Factor VIII cDNA contains an autonomously replicating sequence consensus- and matrix attachment region-like sequence that binds a nuclear factor, represses heterologous gene expression, and mediates the transcriptional effects of sodium butyrate. *Mol Cell, Biol* **16**, 4264-72.

**Foster, P.A., and T.S. Z. (1989):** Factor VIII structure and Function. *Blood Reviews* **3**, 180-191.

**Hoeben, R.C., Fallaux, F.J., Cramer, S.J., van den Wollenberg, D.J., van Ormondt, HI, Briet, E., and van der Eb, A.J. (1995):** Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood* **85**,2447-54.

**Kaufman, R.J. (1992):** Biological regulation of Factor VIII activity. *Annu Rev Med* **43**, 325-39. 45.

**Kaufman, R.J., Wasley, L.C., Davies, M.V., Wise, R.J., Israel, D.I., and Domer, A.J. (1989):** Effects of von Willebrand Factor Coexpression on the Synthesis and Secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1233-1242.

**Koeberl, D.D., Halbert, CL, Krumm, A., and Miller, AD. (1995):** Sequences within the coding regions of clotting Factor VIII and CFTR block transcriptional elongation. *Hum Gene Ther* **6**, 469-79.

**Kozak, M. (1997):** Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* **16**, 2482-92.

**Kurachi S., Hitomi Y., Furukawa M., and Kurachi K. (1995).** Role of the Intrón 1 in the expression of the human Factor IX gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 5276-5281.

**Lind, P., Larsson, KI, Spira, J., Spira, J., Sysow Backman, M., Almstedt, A, Gray, E., and Sandberg, H. (1995):** Novel forms of B-domain-deleted recombinant Factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization. *Eur J Biochem* **232**, 19-27.

**Lynch, C.M., Israel, D.I., Kaufman, R.J., and Miller, AD. (1993):** Sequences in the coding region of clotting Factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Hum Gene Ther* **4**, 259-72.

**Nichols, W.C., Seligsohn, U., Zivellin, A, Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, MA, Moussali, M.J., Hauri, H.-P., Ciavarella, NI, Kaufman, R.J., and Ginsburg, D. (1998):** Mutations in the ER-Golgi Intermediate Compartment Protein ERGIC-53 Cause Combined Deficiency of Coagulation Factors V and VIII. *Cell* **93**, 61-70.

**Pipe, S.W., Morris, J.A., Shah, JI, and Kaufman, R.J. (1998):** Differential Interaction of Coagulation Factor VIII and Factor V with Protein Chaperones Calnexin and Calreticulin. *J. Biol. Chem.* **273**, 8567-8544.

**Pittman, D.D., Alerman, E.M., Tomkinson, K.N., Wang, J.H., Giles, AR, and Kaufman, R.J. (1993):** Biochemical, immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted Factor VIII. *Blood* **81**, 2925-35.

**Pittman, D.D., Marquette, K.A, and Kaufman, R.J. (1994):** Role of the B-domain for Factor VIII and factor V expression and function. *Blood* **84**, 4214-25. 20.

**Vlot, AJ., Koppelman, S.J., Bouma, B.N., and Sixma, J.J. (1998):** Factor VIII and von Willebrand Factor. *Thromb. Haemo.* **79**, 456-465.

## ES 2 269 033 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. cADN modificado de Factor VIII, **caracterizado** porque el dominio B del cADN de Factor VIII tipo silvestre a sido suprimido y se ha insertado un intrón 1 del factor IX truncado SEQ ID NO: 9 en uno o mas diferentes sitios normalmente ocupado por los intrones del cADN del Factor VIII.

10 2. cADN modificado del Factor VIII, como se reivindicó en la reivindicación 1, **caracterizado** porque el dominio B del cADN de Factor VIII tipo silvestre es reemplazado por cuatro argininas.

10 3. cADN modificado del Factor VIII, como se reivindicó en las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el intrón 1 del factor IX truncado) SEQ ID NO: 9 se ha insertado en el sitio normalmente ocupado por los intrones 1 y/o intrón 12 y/o intrón 13.

15 4. Proceso para la producción del Factor VIII, **caracterizado** porque la producción se desarrolla en una línea celular que contiene un cADN modificado de Factor VIII como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 3.

20 5. Transfervector para uso en terapia génica humana, **caracterizado** porque comprende el cADN modificado de Factor VIII de las reivindicaciones 1 a 3.

20

25

30

35

40

45

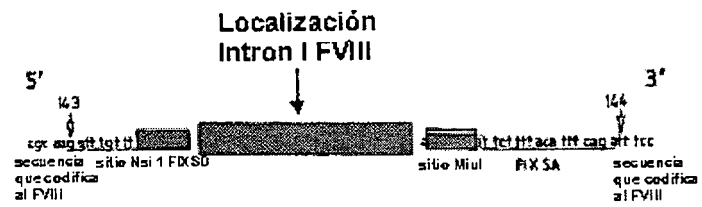
50

55

60

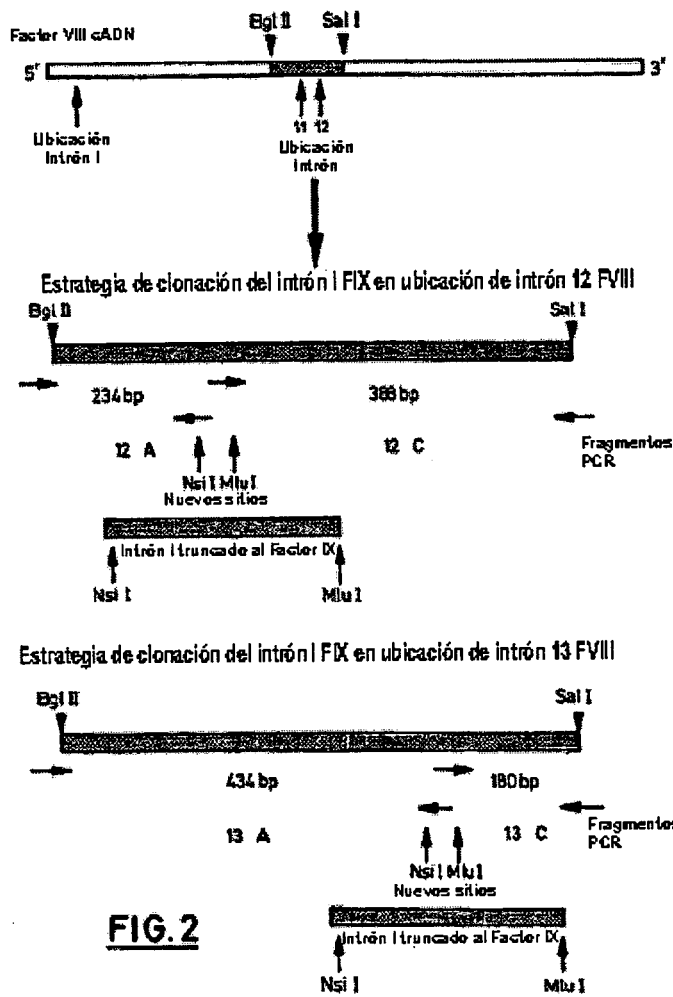
65

Vista esquemática del intrón 1 FIX insertada en la ubicación del intrón 1 FVIII

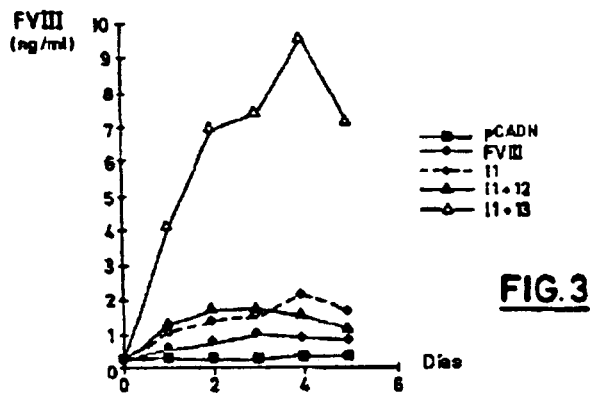


**FIG.1**

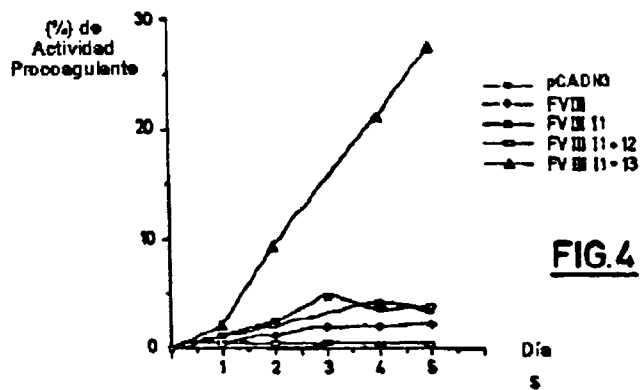
Estrategia de clonación del intrón 1 Factor IX en ubicaciones de intrón 12 y 13



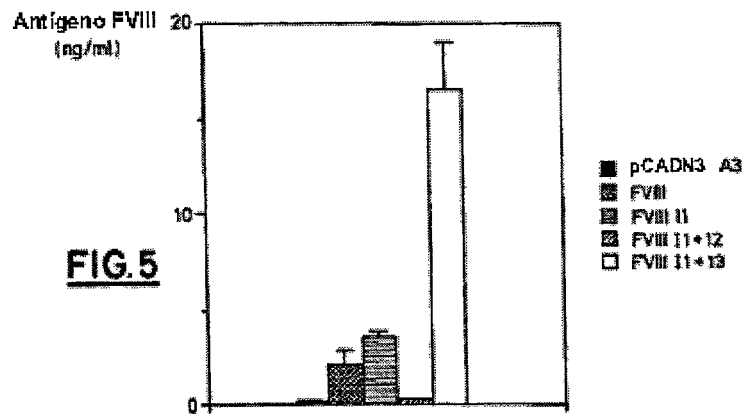
**Cinética de producción FVIII a partir de diferentes líneas celulares transfectadas**



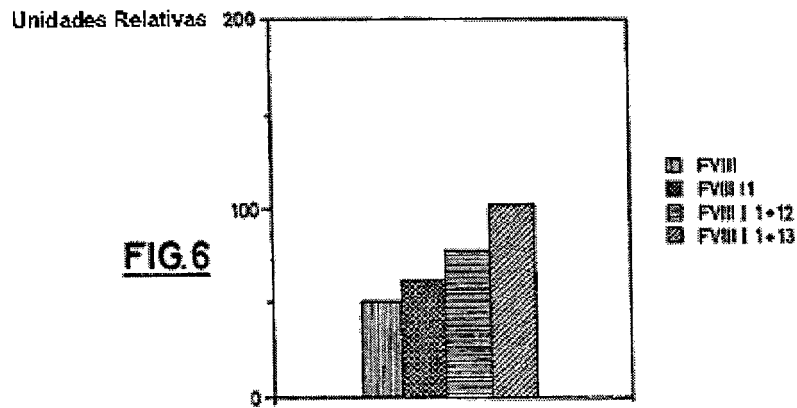
**Actividades procoagulantes a partir de diferentes supernatantes de célula transfectados**



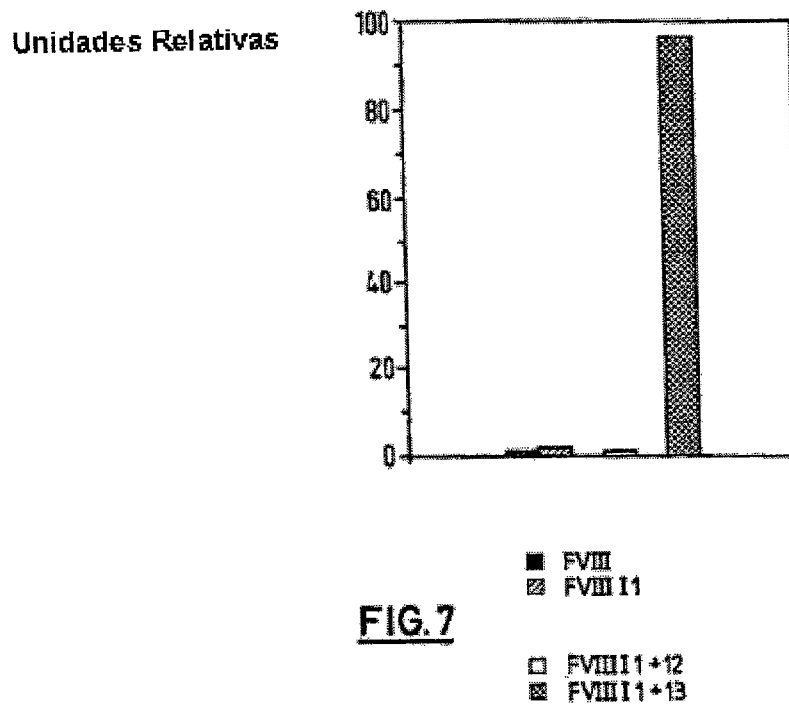
**Producción de antígeno FVIII en línea de célula Hep G2  
(promedio de al menos tres experimentos)**



**Análisis cuantitativo de mRNA FVIII en CHO transfectado  
(promedio de al menos tres experimentos)**



**Cantidad intracelular de FVIII en diferentes líneas celulares**



# ES 2 269 033 T3

## Anexo 1

### LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Aventis Behring GmbH	
	<120> Modified Factor VIII Cdna	
	<130> 1999/Z003-Ma1201-C35	
	<160> 9	
10	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 30	
15	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
20	acacccatgg aatagagct ctccactgc	30
	<210> 2	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
30	agtctgaag ctagatctct ctcc	24
	<210> 3	
	<211> 26	
35	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
40	aatatggaga gagatctagg ttcagg	26
	<210> 4	
45	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
50	ttctcgtcga cgtctcttg gttcaatggc attgtt	36
	<210> 5	
55	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
60	aagacgtcga cgagaataa ctctactac tctt	34
	<210> 6	
65	<211> 26	

## ES 2 269 033 T3

<212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6  
 5                   agcatgtaga tgctcgccaa taaggc 26

<210> 7  
 10 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7  
 15                   attggcggg tggaatgctt tattggcg 28

<210> 8  
 20 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8  
 25                   acacctgag tcagtagagg tctgtgcct cgc 33

<210> 9  
 30 <211> 312  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9  
 35

**gttgtttat gcatCCTTTT TTAAAATACA TTGAGTATGC TTGCCTTTTA**  
**GATATAGAAA 60**  
**TATCTGATGC TGTCTTCTTC ACTAAATTTT GATTACATGA TTTGACAGCA**  
**ATATTGAAGA 120**  
 45 **GTCTAACAGC CAGCACGCAG GTTGGTAAGT ACTGTGGGAA**  
**CATCACAGAT TTTGGCTCCA 180**  
**TGCCCTAAAG AGAAATTGGC TTTCAGATTA TTTGGATTAA AAACAAAGAC**  
 50 **TTTCTTAAGA 240**  
**GATGTAAAAT TTTCATGATG TTTTCTTTT TGCTAAAAC TAAAGAATTAa**  
 55 **cgcgattct 300**  
**tttacattc ag 312**

60

65

# ES 2 269 033 T3

## Anexo 2

### Oligonucleótidos utilizados para introducir TFIXI1 en la secuencia FVIII

5 El oligonucleótido con sentido está siempre presente de primero.  
El oligonucleótido utilizado para introducir los dos sitios de restricción en TFIXI1:

10 FVIII IB-S: 5'-C **AT GCAT** CC TTT TTT AAA ATA CAT TGA G  
**Sitio Nsi I**

15 FVIII-AS: 5'-A **AC GCG T** TA ATT CTT TAG TTT TAG CA  
**Sitio Mlu I**

20 Los oligonucleótidos utilizados para la generación de extremos compatibles con FVIII en el clon en el sitio del intrón 1 del FVIII

#### - Generación de I1A

25 FVIII ATG:5'-ACA CCC ATG GAA ATA GAG CTC TCC ACC TGC

FVIII IA-AS: 5'-A **AT GCA T** (AA ACA AAC) CTT GCG TCC ACA GGC  
AGC TC donador de empalme FIX de sitio Nsi I

#### - Generación de I1B

35 FVIII IC-S: 5'-A **AC GCG T** (AT TCT TTT ACA TTT CAG) ATT TCC TCC  
TAG AGT GCC donador de empalme FIX de sitio Mlu I  
AAA ATCT

40 FVIII 585-AS:5'-TTC TCT ACA T **AC TAG T** AG GGC  
Sitio SpeI FVIII endógeno

45 Los oligonucleótidos utilizados para la generación de los extremos compatibles FVIII para clonar en el sitio del intrón 12 de FVIII

#### - Generación de I12A

50 5'Bgl II: 5'-ATT ATG GAG AGA GAT CTA GCT TCA GG

FVIII 12-AS: 5'-A **AT GCA T** (AA ACA AAC) TGT GCA TGA TGT TGG  
AGG CT donador de empalme FIX de sitio Nsi I

#### - Generación de I12C

60 FVIII 12C-S: 5'-A **AC GCG T** (AT TCT TTT ACA TTT CAG) GCA TCA ATG  
GCT ATG TTT secuencia aceptadora de empalme FIX de sitio Mlu I

4 RAS: 5'-TTC TCG TCG ACG TCT TCT TGG TTC AAT GGC ATT GTT

65

## ES 2 269 033 T3

Los oligonucleótidos utilizados para la generación de los extremos compatibles FVIII para clonar en el sitio del intrón 13 de FVIII

5     - Generación de I13A

5' Bgl II: 5'-ATT ATG GAG AGA GAT CTA GCT TCA GG

10    FVIII 13A-AS: 5'-A AT GCA T (AA ACA AAC) CTG GGT TTT CCA TCG ACA TGA A  
donador de empalme FIX de sitio Nsi I

      - Generación de I13C

15    FVIII 13C-S: 5'-A AC GCG T (AT TCT TTT ACA TTT CAG) GTC TAT GGA

TTC TGG GGT    Aceptor de empalme FIX de sitio Mlu I

4R AS: 5'-TTC TCG ACG TCT TCT TGG TTC AAT GGC ATT GTT

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65