(19) DANMARK

(10) DK/EP 1129186 T4

(12) Oversættelse af ændret europæisk patentskrift

Patent- og Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: *C 12 N 15/12 (2006.01)* *A 61 K 38/37 (2006.01)* *C 07 K 14/755 (2006.01)*
C 12 P 21/02 (2006.01)

(45) Oversættelsen bekendtgjort den: **2017-02-06**

(80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse om opretholdelse af patentet i ændret form: **2016-11-30**

(86) Europæisk ansøgning nr.: **99953425.8**

(86) Europæisk indleveringsdag: **1999-11-10**

(87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: **2001-09-05**

(86) International ansøgning nr.: **AT1999000272**

(87) Internationalt publikationsnr.: **WO2000028021**

(30) Prioritet: **1998-11-10 AT 187298**

(84) Designerede stater: **AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE**

(73) Patenthaver: **Stichting Sanquin Bloedvoorziening, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam, Holland**

(72) Opfinder: **LENTING, Petrus, Johannes, Stoombootweg 8, NL-1035 TW Amsterdam, Holland**
VAN MOURIK, Jan, Aart, Rietwijckstraat 5, NL-1171 HD Badhoevedorp, Holland
PANNEKOEK, Hans, Uiterweg 126, NL-1431 AR Aalsmeer, Holland
MERTENS, Koenraad, Domela Nieuwenhuislaan 14, NL-2314 ES Leiden, Holland
TURECEK, Peter, Hauptstrasse 59g, Weidling, A-3400 Klosterneuburg, Østrig
SCHWARZ, Hans-Peter, Schindlergasse 32, A-1180 Wien, Østrig
SCHEIFLINGER, Friedrich, Michelbeuerngasse 4/17, A-1090 Wien, Østrig

(74) Fuldmægtig i Danmark: **Budde Schou A/S, Hausergade 3, 1128 København K, Danmark**

(54) Benævnelse: **Et faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet**

(56) Fremdragne publikationer:
EP-A- 0 808 901
WO-A-87/07144
WO-A-97/03195
PIPE, S.W. AND KAUFMANN, R.J.: "Factor VIII C2 domain missense mutations exhibit defective trafficking of biologically functional proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 271, Nr. 41, 1996, Seiten 25671-25676, XP000882876
US-A- 5 364 771
LENTING P.J. ET AL: 'The Light Chain of Factor VIII Comprises a Binding Site for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein' THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Bd. 274, Nr. 34, 1999, Seiten 23734 - 23739
BOVENSCHEN N. ET AL: 'Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein and Factor IXa Share StructuralRequirements for Binding to the A3 Domain of Coagulation Factor VIII*' THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Bd. 278, Nr. 11, 14 März 2003, Seiten 9370 - 9377

Fortsættes ...

Den foreliggende opfindelse angår modificerede faktor VIII (FVIII)-polypeptider med FVIII:C-aktivitet, som har modifikationer i A3- og/eller C1-domænet i sekvensen i den lette kæde i faktor VIII, nukleinsyremolekyler, som koder for sådanne modificerede faktor VIII-polypeptider, vektorer og værtsceller, som indeholder nukleinsyremolekylerne, og sammensætninger, som indeholder faktor-VIII-polypeptidet, til behandling af blødningsforstyrrelser.

Blodstørkning involverer samvirke af forskellige hæmostatiske reaktionsruter, som til sidst fører til trombedannelse. Tromber er aflejringer af blodbestanddele på karvæggens overflade og består hovedsagelig af aggregerede blodplader og uopløseligt, tværbundet fibrin. Fibrindannelse finder sted ved begrænset proteolyse af fibrinogen med koagulationsenzymet thrombin. Dette enzym er slutproduktet af koagulationskaskaden, en rækkefølge af zymogenaktiveringer, som finder sted på overfladen af aktiverede blodplader og leukocytter, og en mangfoldighed af vaskulære celler (for et overblik jfr. K.G. Mann et al., Blood, 1990, bind 76, side 1-16).

En nøglefunktion i koagulationskaskaden ligger i aktiveringen af faktor X med komplekset af aktiveret faktor IX (faktor IXa) og aktiveret faktor VIII (faktor VIIIa). En deficiens eller en dysfunktion i bestanddelene i dette kompleks er forbundet med den som hæmofili kendte blødersygdom (J.E. Sadler & E.W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B, and von Willebrand's disease, i G. Stamatoyannopoulos et al. (udg.): The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, side 576-602). Hæmofili A angår en deficiens i faktor VIII-aktiviteten, hvorimod hæmofili B vedrører en faktor IX-deficiens. Den traditionelle behandling består i erstatningsterapi ved anvendelse af farmaceutiske præparater, som består af normale koagulationsfaktorer. Af disse koagulationsforstyrrelser er hæmofili A den hyppigste, af hvilken ca. én af 10.000 mænd rammes. Erstatningsterapien omfatter ved hæmofili A gentagen indgivelse af præparater, som indeholder normal faktor VIII, ved intravenøs infusion. Intervallet mellem infusioner afhænger af nedbrydningen af faktor VIII-aktiviteten i blodkredsløbet. Halveringstiden af faktor VIII-aktiviteten efter infusionen er forskellig alt efter individ og ligger i området 10 til 30 timer. Til en profylaktisk terapi er det således nødvendigt med en infusion hver anden til hver tredie dag. Dette udgør en stor belastning i hæmofilipatienters liv, især når veneadgangen er blevet vanskelig ved lokal ardannelse på grund af de hyppige nålestik til den intravenøse infusion. Det ville være særdeles fordelagtigt, hvis infusionshyppigheden kunne nedsættes ved anvendelsen af faktor VIII med længere halveringstid. Halveringstiden af faktor VIII kan forlænges ved indgreb i

mekanismen i faktor VIII-nedbrydningen (clearance), fx ved nedsættelse af affiniteten af faktor VIII til receptorer, som spiller en rolle ved dens clearance, enten direkte, idet man modificerer faktor VIII på dets bindingssted(er) for de pågældende clearancereceptorer, eller indirekte, idet man anvender forbindelser, som griber ind i vekselvirkningen hos faktor VIII med disse receptorer. Udformningen af sådanne stoffer er dog hidtil blevet forhindret af, at man ikke kendte faktor VIII-clearance-mekanismen, de i denne proces involverede cellereceptorer og de i faktor VIII-receptor-vekselvirkningen involverede molekylesteder.

På det molekylære plan er der begrænsede kendskaber til faktor VIII-clearancemekanismen. Faktor VIII-proteinet syntetiseres som enkeltkæde-polypeptid med 2332 aminosyrer med den typiske domænestruktur A1-A2-B-A3-C1-C2 (G.A. Vehar et al., Nature, bind 312, 1984, side 337-342; J.J. Toole et al., Nature, bind 312, 1984, 342-347). Som følge af intracellulær endoproteolytisk forarbejdning indtræder faktor VIII i blodkredsløbet som heterodimert kompleks med tung og let kæde. Den lette kæde omfatter aminosyreresterne 1649-2332 og indeholder A3-C1-C2-domænerne. Den tunge kæde indeholder domænerne A1-A2-B (resterne 1-1648) og er som følge af den begrænsede proteolyse heterogen på en række positioner inden for B-domænet. Faktor VIII-heterodimeren har ingen biologisk aktivitet, men bliver aktiv som cofaktor for enzymet faktor IXa efter proteolytisk aktivering med thrombin eller faktor Xa. Proteolysen angår både den tunge og den lette kæde i faktor VIII (M.J.S.H. Donath et al., J. Biol. Chem., bind 270, 1995, side 3648-3655) og fører til fraspaltning af et amino-terminalt fragment af den lette kæde og til spaltning på domæneforbindelsesstederne i den tunge kæde (mellem domænerne A1-A2 og A2-B). Den aktiverede cofaktor kaldes faktor VIIIa og er en heterotrimer, bestående af A1-domænet, A2-domænet og den lette kæde, som omfatter domænerne A3-C1-C2.

Af denne grund er det velkendt, at halveringstiden af den ikke-aktiverede faktor VIII-heterodimer afhænger stærkt af tilstedeværelsen af von Willebrand-faktoren, som har stærk affinitet til faktor VIII (men ikke til faktor VIIIa) og tjener som bærer-protein (J. E. Sadler og E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand's disease, i G. Stamatoyannopoulos et al. (udg.): The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, side 576-602). Det er kendt, at patienter med von Willebrand-sygdom af type 3, som ikke har nogen påviselig Willebrand-faktor i deres blodkredsløb, også har en sekundær deficiens på faktor VIII. Endvidere andrager

halveringstiden af intravenøst indgivet faktor VIII hos disse patienter 2 til 4 timer, hvilket er betydeligt kortere end de hos hæmofili-A-patienter iagttagne 10 til 30 timer.

Disse konstateringer indebærer, at faktor VIII er tilbøjelig til en hurtig clearance ud af blodkredsløbet, og at denne proces til en vis grad hæmmes af kompleksdannelsen med dens naturlige bærer, von Willebrand-faktor. Alligevel er halveringstiden uønsket kort.

For kort tid siden blev det antydet i en foreløbig rapport, at med thrombin aktiveret faktor VIII bindes til Low Density lipoprotein-receptor-protein ("LRP") (A. Yakhyaev et al., Blood, bind 90 (Suppl. 1), 1997, 126-I (sammendrag). Dette sammendrag beskriver celleoptagelsen og nedbrydningen af thrombinaktiverede faktor VIII-fragmenter og anfører, at A2-domænet, men ikke de andre to underenheder i faktor VIIIa-heterotrimeren, træder i vekselvirkning med cellebundet LRP. Forfatterne foreslår, at A2-domænebindingen til LRP yderligere destabiliserer den løse vekselvirkning i A2-domænet i faktor VIIIa-heterotrimeren og således regulerer faktor VIIIa-aktiviteten nedad.

Man ved, at LRP er en af de receptorer, som spiller en rolle ved clearance af forskellige proteiner. LRP er på dette område også kendt som α2-makroglobulin-receptor, og den hører til familien af Low Density lipoprotein(LDL)-receptorer. Den består af to ikke-kovalent forbundne polypeptidkæder: en α-kæde (515 kDa) og en β-kæde (85 kDa) [for et overblik jfr. D.K. Strickland et al., FASEB J. bind 9, 1995, side 890-898]. LRP er en multiligand-receptor for lipoprotein- og proteinase-katabolisme. β-Kæden indeholder et transmembran-domæne og en kort cytoplasmatisk hale, som er essentiel for endocytosen. α-Kæden fungerer som stort ektodomæne og indeholder tre typer gentagelser: epidermale vækstfaktoragtige domæner, Tyr-Trp-Thr-Asp-sekvenser og LDL-receptor-klasse-A-domæner. Disse klasse-A-domæner foreligger i fire særskilte klaser, den såkaldte klase I (2 domæner), II (8 domæner), III (20 domæner) og IV (11 domæner), for hvilke det er påvist, at de spiller en rolle ved ligandbinding. LRP udtrykkes i et stort antal væv, især i placenta, lunge, hjerne og lever. I leveren er LRP til stede på parenchymceller og kobberceller. Desuden udtrykkes LRP i et stort antal celletyper, såsom fibroblaster, glatte muskelceller, Leydig- og Sertoli-celler og monocytter. Differentieringen af monocytter til makrofager er forbundet med en kraftig stigning i LRP-ekspressionen. Endelig udtrykkes LRP også i cellearter, såsom abenyreceller (COS) eller Chinese Hamster-ovarieceller (CHO) (D.J. FitzGerald et al., J. Cell Biol. bind 129, 1995, side 1533-1541), som begge ofte anvendes til ekspression af pattedyrproteiner,

herunder faktor VIII (R.J. Kaufman et al., Blood Coag. Fibrinol. bind 8 (suppl. 2), 1997, side 3-14).

LRP spiller en rolle ved clearance af et stort antal ligander, herunder proteaser, inhibitorer af Kunitz-type, protease-serpin-komplekser, lipaser og lipoproteiner, hvilket forklarer, at LRP spiller en væsentlig rolle ved forskellige fysiologiske og patofysiologiske clearance-processer (Narita et al., Blood, bind 2, side 555-560, 1998; Orth et al., Proc. Natl. Acad. Sci., bind 89, side 7422-7426, 1992; Kounnas et al., J. Biol. Chem., bind 271, side 6523-6529, 1996). Dets fysiologiske betydning fremgår især af det forhold, at LRP-knock-out-mus ikke overlever det embryonale stadium (Herz, J. Curr. Opin. Lipidol. bind 4, 1993, side 107-113). Sekretionen af LRP kan vanskeliggøres af, at det træder i vekselvirkning med mange ligander. Inde i cellen er LRP dog associeret til sit chaperoneprotein, det receptorassocierede protein (RAP). Når det er bundet til RAP, kan LRP'et ikke træde i vekselvirkning med nogen af sine kendte ligander (Herz et al., J. Biol. Chem., bind 266, side 21232-21238, 1991).

LRP's vekselvirkning med sine naturlige ligander kan effektivt blokeres med opløselige LRP-fragmenter. Disse kan opnås på mange, på dette område kendte metoder, herunder rekombinante teknikker, og tilvejebringer som sådanne en tilgang til effektive LRP-antagonisten (I.R. Horn, J. Biol. Chem., bind 272, 1997, side 13608-13613; B. Vash et al., Blood, bind 92, 1998, side 3277-3285).

I betragtning af LRP's typiske rolle ved clearance af proteaser, inhibitorer og protease-inhibitor-komplekser, kan det fastslås, at LRP også binder den aktiverede, ikke-enzymatiske cofaktor faktor VIIIa (A. Yakhyaev et al., Blood bind 90 (suppl. 1), 1997, 126-I (sammendrag)). Mens denne afsløring antyder en rolle hos LRP ved faktor VIIIa-reguleringen, mangler den dog enhver henvisning til en rolle ved LRP-reguleringen af ikke-aktiveret, heterodimer faktor VIII, selv om dette potentielt ville være af interesse for clearancen af faktor VIII fra blodkredsløbet - og således for halveringstiden af faktor VIII.

Inden for den kendte teknik er der udført flere forsøg på at forbedre faktor VIII's farmakokinetisk profil, herunder modifikationer i forskelllige regioner af FVIII-polypeptidet:

WO 87/07144 beskriver forskellige modifikationer på proteolytiske beskæringssteder, som omfatter arginin- og lysinrester, til nedsættelse af molekylernes labilitet over for en

specifik proteasekatalyseret spaltning, fx faktor Xa-beskæringsstedet mellem Arg 1721 og Ala 1722.

WO 95/18827, WO 95/18828 og WO 95/18829 beskriver faktor VIII-derivater med modifikationer i A2-området i den tunge kæde.

WO 97/03193 offentliggør faktor VIII-polypeptid-analoger, hvor modifikationerne omfatter ændringen af molekylets metalbindingsegenskaber.

I WO 97/03195 beskrives faktor VIII:C-polypeptid-analoger, hvor der er tilvejebragt modifikationer på en eller flere aminosyrerester, som grænser til en Arg-rest.

EP-0 808 901 beskriver konstruktionen af faktor VIII-varianter med mindst en mutation i mindst en immundominant region af faktor VIII og anvendelsen af disse faktor VIII-varianter til behandling af patienter med faktor VIII-inhibitorer. Disse modifikationer fører ikke til en forlænget halveringstid eller øget stabilitet af faktor VIII-varianten, hverken in vivo eller in vitro.

Mutationen i området faktor VIII C2-domænet (R2307Q, R2307L, R2305F og Y2332F) er beskrevet af Pipe et al. (JBC, 271 (41) (1996), 25671-25676).

Med hensyn til tekikkens stade offentliggør ingen af dokumenterne nogen henvisning til, at en modifikation i den lette kæde i faktor VIII fører til en modificeret bindingsaffinitet til en cellereceptor og som følge deraf til nedsat clearance af faktor VIII-proteinet og til en forlænget halveringstid og øget stabilitet af faktor VIII.

Det er derfor den foreliggende opfindelses opgave at tilvejebringe et faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet med øget halveringstid og/eller øget stabilitet af faktor VIII-proteinet in vivo og/eller in vitro.

I overensstemmelse hermed tilvejebringes der ifølge den foreliggende opfindelse et humant faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet, som har en modifikation mellem AS 1784 (Ser) og 1831 (Asp) og/eller AS 2108 (Asp) og 2118 (Asn), idet modifikationen er en mutation, udeladelse eller indsættelse, som nedsætter bindingsaffiniteten til LRP (alle aminosyrenummereringer, som i den foreliggende tekst er foretaget med hensyn til

faktor VIII-sekvensen, henviser til nummeringen hos Vehar et al. (Nature, bind 312, 1984, side 337-342).

Modifikationen befinder sig fortrinsvis i C1-domænet mellem AS 2108 (Asp) og 2118 (Asn). Endnu mere foretrukket befinder modifikationen sig mellem AS 2112 (Trp) og 2115 (Tyr).

Inden for rammerne af den foreliggende opfindelse viste det sig, at inhiberingen af LRP ved dets antagonist, RAP, fører til en akkumulation af den lette kæde i faktor VIII i mediet. Dette beviser, at den cellulære optagelse af faktor VIII-heterodimeren omfatter en LRP-afhængig mekanisme.

Det har overraskende vist sig, at modifikationerne ifølge opfindelsen fører til en lignende virkning, dvs. forhøjet halveringstid og stabilitet af faktor VIII-proteinet.

På grundlag af modifikationen i faktor VIII-molekylet aftager bindingsaffiniteten til LRP, og proteinets hurtige clearance inhiberes. Denne konstatering åbner nye muligheder for forbedret behandling af koagulationsforstyrrelser, hvilket ville kunne være nødvendigt ved fremstillingen af faktor VIII-sammensætningerne.

På grundlag af modifikationen i faktor VIII-polypeptidet kan forøgelsen af in vivo- og in vitro-halveringstiden af faktor VIII-molekylet ifølge den foreliggende opfindelse andrage mindst 10%, fortrinsvis 25%, mere foretrukket 50%, mere foretrukket 90%, i sammenligning med vildtype-faktor VIII-proteinet.

Disse faktor VIII-polypeptider eller faktor VIII-varianter ifølge den foreliggende opfindelse udøver deres fordelagtige virkning, fordi de udgør interaktive regioner (exosteder, "Exosites"), der befinder sig på underenhederne af faktor VIII-heterodimeren, især på den lette kæde i faktor VIII (domæner A3-C1-C2). Udtrykket "exosted" anvendes her i større betydning og henviser til den relativt hydrofile del af proteinet, som især er rettet mod overfladen af faktor VIII-molekylet (Kyte og Doolittle, J. Mol. Biol., bind 157, side 105-132, 1982).

Selv om fremgangsmåden ifølge Kyte & Doolittle arbejder med principper, der allerede er anerkendte på dette område og er baseret på faktor VIII-sekvensen, således som den

tidligere er offentliggjort, er der hidtil praktisk taget ikke ofret nogen opmærksomhed på disse hydrofile exosteder.

Exostedet ved AS Ser 1784 til Asp 1831 inkluderer fx bindingsregionen af faktor IX, som allerede er beskrevet i litteraturen (AS 1801 til 1823, P.J. Lenting et al., J. Biol. Chem., bind 271, side 1935-1940). Dette er en tydelig henvisning til relevansen af hydropatikurver, som anvendes til identificering af exosteder. Udtrykket "bindingssted" henviser her til et typisk sekvensmønster af aminosyrer, herunder naturlige og syntetiske analoger deraf, som har de minimale krav til bindingen af ikke-aktiveret faktor VIII til LRP.

I en første gruppe særligt foretrukne udførelsesformer for opfindelsen har polypeptidet en modifikation i et eller flere af exostederne inde i sekvensen af faktor VIII-polypeptidet, fortrinsvis i den lette kæde i faktor VIII, og mere foretrukket faktor VIII-A3- og C1-domænet. Endvidere stammer disse polypeptider fortrinsvis fra sekvensen af human faktor VIII, selv om opfindelsen omfatter bindingssteder, som er baseret på exosteder af faktor VIII fra en vilkårlig pattedyrart.

Modifikationen kan fx udføres ved dirigeret in vitro-mutagenese eller PCR eller andre metoder inden for genteknikken, der hører til den kendte teknik, som er egnet til den specifikke ændring af en DNA-sekvens til dirigeret ombytning af aminosyrer (Current Protocols in Molecular Biology, bind 1, kap. 8 (Ausubel et al., udg., J. Wiley and Sons, 1989 & Supp. 1990-93); Protein Engineering (Oxender & Fox udg., A. Liss, Inc. 1987)). Denne modifikation kan være en mutation, udeladelse eller indsættelse i området i den lette kæde i faktor VIII.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer endvidere den nukleinsyre, som koder for ethvert af de modificerede faktor VIII-proteiner, der er omfattet af den foreliggende opfindelse. Nukleinsyren kan være DNA eller RNA. Nukleinsyren er indeholdt i en ekspressionsvektor, som tilvejebringer de egnede elementer til ekspression af dette DNA eller RNA. Ekspressionsvektoren kan fx i transskriptionsretningen have en transskriptional reguleringsregion og en translational initieringsregion, som er funktionelle i en værtscelle, en for FVIII-polynukleotidet ifølge den foreliggende opfindelse kodende DNA-sekvens og translationale og transskriptionale termineringsregioner, som er funktionelle i denne værtscelle, idet ekspressionen af nukleinsyresekvensen reguleres af

initierings- og termineringsregionerne. Ekspressionsvektoren kan også indeholde elementer til replikation af dette DNA eller RNA. Ekspressionsvektoren kan være en DNA- eller en RNA-vektor. Eksempler på DNA-ekspressionsvektorer er pBPV, pSVL, pRc/CMV, pRc/RSV, myogene vektorsystemer (WO 93/09236) eller vektorer, der stammer fra virussystemer, fx fra vacciniavirus, adenovira, adenoassocieret virus, herpesvira, retrovira eller baculovira. Eksempler på RNA-ekspressionsvektorer er vektorer, der stammer fra RNA-vira, såsom retrovira eller flavivira.

Til nogle specifikke anvendelser i genterapien, dvs. når selve nukleinsyren indsprøjtes i et organ i et pattedyr, kan nukleinsyren, DNA såvel som RNA, være kemisk modificeret. De kemiske modifikationer kan være modifikationer, som beskytter nukleinsyren mod nukleasefordøjelse, fx ved stabilisering af grundskelettet eller terminalerne.

Den ekspressionsvektor, der indeholder nukleinsyren, som koder for det modificerede faktor VIII-polypeptid ifølge den foreliggende opfindelse, kan anvendes til transformation af værtsceller, som derefter frembringer dette polypeptid. De transformerede værtsceller kan dyrkes i et cellekultursystem til frembringelse af dette polypeptid in vitro. Værtscellerne kan udskille det modificerede faktor VIII-polypeptid i cellekulturmediet, hvorfra det kan oprenses. Værtscellerne kan også beholde det modificerede faktor VIII-polypeptid i det indre af deres cellevægge, og hybrid-proteinet kan fremstilles ud fra værtscellerne.

Værtscellerne kan være celler, som stammer fra et pattedyrs krop, fx fibroblaster, keratinocytter, hæmatopoietiske celler, hepatocytter eller myoblaster, som in vitro transformeres med et ekspressionsvektorsystem, som bærer nukleinsyren ifølge den foreliggende opfindelse, og genimplanteres i pattedyret. Det via denne nukleinsyre kodede faktor VIII-polypeptid syntetiseres gennem disse celler in vivo, og de vil vise en ønsket biologisk aktivitet i pattedyret. Ifølge en specifik udførelsesform er pattedyret en human patient, der lider af hæmofili.

Den for det modificerede faktor VIII-polypeptid ifølge den foreliggende opfindelse kodende nukleinsyre kan også anvendes til at skabe transgene dyr, som udtrykker disse modificerede faktor VIII-polypeptidproteiner in vivo. Ved en udførelsesform for denne specifikke anvendelse kan de transgene dyr producere faktor VIII-polypeptidet i endogene kirtler, fx i brystkirtler, hvorfra disse proteiner udskilles. I tilfælde af brystkirtler

kan disse faktor VIII-proteiner udskilles i dyrenes mælk, hvoraf proteinerne kan fremstilles. Dyrene kan være mus, kreaturer, svin, geder, får, kaniner eller et hvilket som helst andet kommercielt nyttigt dyr.

Ekspressionsvektoren, der indeholder nukleinsyren, som koder for ethvert faktor VIII-polypeptid, der er omfattet af den foreliggende opfindelse, kan endvidere indgives til et pattedyr uden forudgående in vitro-transformation i værtsceller. Den praktiske baggrund for denne art genterapi er offentliggjort i flere patentansøgninger, fx i WO 90/11092. Ekspressionsvektoren, der indeholder denne nukleinsyre, blandes med en egnet bærer, fx en fysiologisk pufferopløsning, og indsprøjtes i et organ, fortrinsvis et pattedyrs skeletmuskel, hud eller lever. Pattedyret er fortrinsvis et menneske og mere foretrukket et menneske, der lider af en genetisk defekt, mest foretrukket lider mennesket af en blodkoagulationsforstyrrelse. I en særlig udførelsesform er pattedyret en human patient, der lider af hæmofili, og den nukleinsyre, som er indeholdt i ekspressionsvektoren, koder som beskrevet for det modificerede faktor VIII-polypeptid.

Det er en fordel, at det modificerede faktor VIII-protein ifølge den foreliggende opfindelse har en faktor VIII-prokoagulansaktivitet på mindst 50%, mere foretrukket mindst 80%, især mindst 100%, af faktor VIII-prokoagulansaktiviteten af faktor VIII-protein uden den modifikation, som fører til nedsat bindingsaffinitet til LRP, fx af et i handlen tilgængeligt faktor VIII-præparat, som er baseret på rekombinant eller plasmatisk faktor VIII:C.

Evalueringen af faktor VIII-prokoagulansaktiviteten kan udføres ved hjælp af enhver egnet prøve, især ved hjælp af de prøver, som rutinemæssigt udføres ved undersøgelse af faktor VIII-prøver, såsom 1-trinskoagulationsprøven, som fx beskrevet hos Mikaelsson og Oswaldson, Scand. J. Haematol. suppl. 33, side 79-86, 1984, eller en kromogen prøve, såsom faktor VIII IMMUNOCHROM (Immuno).

Faktor VIII-aktiviteten kan også bestemmes ved måling af evnen hos faktor VIII til at virke som cofaktor for faktor IXa ved omdannelsen af faktor X til faktor Xa, hvor der anvendes et kromogent substrat for faktor Xa (Coatest Factor VIII, Chomogenix, Mölndal, Sverige). Desuden kan der anvendes andre prøver, som tjener til at bestemme mængden af faktor VIII-aktivitet i en prøve, til undersøgelse af faktor VIII-aktiviteten i de modificerede proteiner, der er beskrevet ifølge den foreliggende opfindelse.

Den konkrete prøve, om et eller andet nyt modificeret faktor VIII-protein har en bestemt procentsats af faktor VIII-prokoagulansaktivitet, udføres fortrinsvis parallelt med en prøve på det samme faktor VIII-molekyle uden modifikationen i LRP-bindings-domænet (fx faktor VIII-vildtype eller en fuldt aktiv faktor VIII med udeladt B-domæne). Ved en sådan justeret prøve af det muterede faktor VIII-molekyle kan den relative prokoagulansaktivitet (procentsatsen af aktivitet i sammenligning med 100% aktivitet af vildtype eller faktor VIII med B-domæneudeladelse) udføres uden risiko for en fejl, der kan føres tilbage på miljøfaktorer. Da resultaterne ved in vitro-prøver af faktor VIII-prokoagulansaktivitet ofte rammes af fejl, som kan føres tilbage til deres kunstige natur, undersøges begge egenskaber fortrinsvis også ved in vivo- eller ex vivo-prøver til opnåelse af mere pålidelige resultater af deres aktivitetsværdier.

Som ved in vitro-prøverne foretrækkes der også parallelprøver af faktor VIII-molekylet uden modifikationen, når man udfører in vivo-prøver. Egnede dyremodeller til evaluering af faktor VIII:C-aktiviteten er beskrevet i WO 95/01570 og EP 0 747 060.

Præparatet ifølge den foreliggende opfindelse kan tilvejebringes som farmaceutisk præparat med modificeret faktor VIII-polypeptid ifølge den foreliggende opfindelse i form af et enkeltkomponentpræparat eller i kombination med andre bestanddele i form af et flerkomponentsystem. I en speciel udførelsesform kan faktor VIII-proteinerne eller de modificerede faktor VIII-molekyler ifølge opfindelsen kombineres med et eller flere polypeptider, som selektivt inhiberer bindingen og internaliseringen af faktor VIII via Low Density lipoprotein-receptor-beslægtet protein (LRP), hvor polypeptidet er RAP.

Til et andet formål tilvejebringer den foreliggende opfindelse en sammensætning, som har et faktor VIII-molekyle og et eller flere polypeptider, som antagonistisk griber ind i vekselvirkningen mellem faktor VIII og LRP og derfor selektivt inhiberer bindingen og internaliseringen af faktor VIII via Low Density lipoproteinreceptorbeslægtet protein (LRP). Fortrinsvis er dette polypeptid RAP eller et opløseligt LRP-fragment med antagonistisk virkning. Fortrinsvis bindes det opløselige LRP-fragment til FVIII i FVIII-LRP-bindingsregionen.

Disse præparater kan anvendes som aktiv bestanddel i farmaceutiske sammensætninger til behandling af patienter, der lider af genetiske forstyrrelser, fortrinsvis koagulationsforstyrrelser, og mest foretrukket af hæmofili, fx hæmofili A. Disse forbindelser kan endvidere anvendes som aktiv bestanddel i farmaceutiske sammensætninger til

behandling af patienter, der lider af forbigående forstyrrelser i deres trombotiske eller fibrinolytiske systemer, fx før, under eller efter en operation.

Ifølge den foreliggende opfindelse er en farmaceutisk sammensætning bestemt til indgivelse til pattedyr, fortrinsvis mennesker. Ved fremstillingen af det farmaceutiske produkt blandes forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse, det modificerede faktor VIII-polypeptid, nukleinsyrerne, som koder herfor, eller de transformerede celler, som kan udtrykket det in vivo, med fysiologisk acceptable bærere.

De ifølge den foreliggende opfindelse offentliggjorte sammensætninger kan formuleres til indgivelse på enhver egnet måde, og opfindelsen omfatter også farmaceutiske sammensætninger, der indeholder en terapeutisk effektiv mængde af faktor VIII. Sådanne sammensætninger kan formuleres på traditionel måde under anvendelse af en eller flere farmaceutisk acceptable bærere eller excipienser. Egnede bærere omfatter fortyndingsmidler eller fyldstoffer, sterile vandige medier og forskellige ikke-toksiske organiske opløsningsmidler, men er dog ikke begrænset hertil. Sammensætningerne kan formuleres i form af pulvere, vandige suspensioner eller opløsninger, injicerbare opløsninger eller lignende. Egnede doseringsformer kan let identificeres af fagmanden.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til behandling af koagulationsforstyrrelser skal udføres under anvendelse af et doseringsskema, som sikrer maksimal terapeutisk reaktion, indtil der er nået en bedring, og derefter af en effektiv mindstemængde, der giver en egnet beskyttelse mod blødning. Doseringen til intravenøs indgivelse kan variere mellem ca. 10 og 300 IE/kg kropsvægt, fortrinsvis mellem ca. 10 og 100 IE/kg kropsvægt og mere foretrukket mellem 20 og 40 IE/kg kropsvægt. Den egnede dosering kan også afhænge af patientens almene sundhedstilstand, alder og andre faktorer, som kan påvirke reaktionen på lægemidlet. Lægemidlet kan indgives ved kontinuerlig infusion eller med regelmæssige intervaller for at holde den terapeutiske virkning på det ønskede niveau.

Et andet aspekt af opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af modificerede faktor VIII-molekyler ifølge opfindelsen, som har en modifikation i den lette kæde. Den for det modificerede faktor VIII-molekyle kodende sekvens indsættes i et egnet ekspressionssystem, fx en ekspressionsvektor, og egnede celler transficeres med det rekombinante DNA. Fortrinsvis etableres permanente cellelinier, som udtrykker den modificerede faktor VIII. Cellerne dyrkes under optimale betingelser for genekspression,

og modificeret faktor VIII isoleres enten fra en cellekulturekstrakt eller fra den ovenstående væske i cellekulturen. Det rekombinante molekyle kan renses yderligere-ved hjælp af alle kendte kromatografiske metoder, såsom anion- eller kationombytning-, affinitets- eller immunoaffinitetskromatografi eller en kombination deraf.

Den modificerede faktor VIII produceres fortrinsvis ved rekombinant ekspression. De kan fremstilles genteknisk med alle sædvanlige ekspressionssystemer, som fx permanente cellelinier eller virale ekspressionssystemer. Permanente cellelinier fremstilles ved stabil integrering af fremmed-DNA'et i værtscellegenomet af fx Vero-, MRC5-, CHO-, BHK-, 293-, Sk-Hep1-, især lever- og nyreceller, fibroblaster, keratinocytter eller myoblaster, hepatocytter eller stamceller (undtaget humane embryonale stamceller), fx hæmatopoietiske stamceller, eller med en episomal vektor, som fx stammer fra Papilloma-virus. Virusekspressionssystemer, som fx vacciniavirus-, baculovirus- eller retrovirussystemet kan ligeledes anvendes. Som cellelinier anvendes sædvanligvis Vero-, MRC5-, CHO-, BHK-, 293-, Sk-Hep1-, kirtel-, lever- og nyreceller. Som eukaryotiske ekspressionssystemer kan anvendes gærceller og endogene kirtelceller (fx kirtler fra transgene dyr) og også andre arter celler. Naturligvis kan der også anvendes transgene dyr til ekspression af polypeptiderne ifølge opfindelsen eller derivater deraf. Til ekspression af rekombinante proteiner har CHO-DHFR-celler vist sig særlig egnede (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, bind 77, side 4216-4220, 1980).

Til rekombinant fremstilling af modificeret faktor VIII ifølge den foreliggende opfindelse kan der også anvendes prokaryotiske ekspressionssystemer. Systemer, som mliggør en ekspression i E. coli eller B. subtilis, er særlig egnede.

Faktor VIII-polypeptidet ifølge den foreliggende opfindelse udtrykkes i de respektive ekspressionssystemer under kontrol af en egnet promotor. Til ekspressionen i eukaryoter er alle kendte promotorer egnede, som fx SV40, CMV, RSV, HSV, EBV, β-actin, hGH eller inducerbare promotorer, som fx hsp eller metallothionein-promotor.

Ifølge den foreliggende opfindelse kan en faktor VIII-cDNA af den samlede længde samt vilkårlige derivater deraf, som har faktor VIII:C-aktivitet (fx B-domæne-udeladte faktor VIII-mutanter, FVIII-mutanter, med delvis udeladte B-domæner) anvendes som udgangsmateriale til konstruktion af det modificerede faktor VIII-polypeptid. Det kan stamme fra enhver pattedyrart, fortrinsvis fra human-, svine- eller kreaturkilder.

Opfindelsen forklares i de nedenfor beskrevne eksempler. Selv om eksemplet på den foreliggende opfindelse med hensyn til identificering, fremstilling og anvendelse vedrører forbedrede sammensætninger med nedsat binding af faktor VIII's lette kæde til LRP, skal opfindelsen udlægges således, at den også kan anvendes på LRP-bindingen af faktor VIII's tunge kæde. Variationer inden for fagmandens synsfelt skal anses for at falde inden for området for den foreliggende opfindelse. Såfremt intet andet er defineret, har alle de heri anvendte tekniske og videnskabelige udtryk samme betydning, som de alment forstås af gennemsnitsfagmanden på denne opfindelses område. Selv om alle metoder og materialer, der ligner de her beskrevne eller er ækvivalente hermed, kan anvendes i praksis eller til afprøvning af den foreliggende opfindelse, beskrives kun foretrukne metoder og materialer.

De følgende eksempler og figurer illustrerer den foreliggende opfindelse, men begrænser på ingen måde dens omfang.

Figur 1 viser vekselvirkninger mellem faktor VIII (felt A), thrombinaktiveret faktor VIII (faktor VIIIa, felt B), den tunge kæde i faktor VIII (felt C) eller den lette kæde i faktor VIII (felt D) og immobiliseret LRP under anvendelse af overfladeplasmonresonans-analyse. Detaljer er givet i eksempel I. En sammenligning af felterne A til D viser, at faktor VIII, thrombinaktiveret faktor VIII og den lette kæde i faktor VIII, men ikke den tunge kæde i faktor VIII, kommer effektivt i vekselvirkning med LRP.

Figur 2 viser, at den lette kæde i faktor VIII på reversibel og dosisafhængig måde bindes til immobiliseret LRP. Det kinetiske parameter af denne vekselvirkning er sammenfattet i tabel II, som er forklaret i eksempel II. Bindingen bedømtes som beskrevet i eksempel II.

Figur 3 viser virkningen af LRP-antagonisten RAP på koncentrationen af den lette kæde i faktor VIII i et medium af celler, der udtrykker den lette kæde i faktor VIII. Forsøgene udførtes som beskrevet i eksempel III. I fravær af RAP (åbne symboler) er stigningen af den lette kæde i faktor VIII i mediet mindre, end når det er til stede (lukkede symboler).

Figur 4 viser virkningen af LRP-antagonisten RAP på koncentrationen af den intakte faktor VIII-heterodimer i mediet af de celler, der udtrykker faktor VIII. Forsøgets detaljer er beskrevet i eksempel IV. I fravær af RAP (åbne symboler) er stigningen i faktor VIII-aktivitet mindre, end når det er til stede (lukkede symboler).

Figur 5A og B viser hydropatikurver af domænerne A3, C1 og C2 i den lette kæde af faktor VIII. Kurven udarbejdedes som beskrevet i eksempel VI. Kurven viser tilstedeværelsen af forskellige enkelte regioner med lave hydropativærdier, hvilket viser den hydrofile karakter af potentielt eksponerede exosteder. Disse er vist som A til K (figur 5A) og I til IV (figur 5B).

Figur 6 viser vekselvirkningen af C2-domænet i faktor VIII med immobiliseret LRP i tilstedeværelse af det C2-domænerettede antistof ESH-8. Bindingen analyseredes under anvendelse af overfladeplasmonresonans som beskrevet i eksempel VII. I fravær af C2-domænet viser ESH-8 ingen signifikant binding til immobiliseret LRP. I nærvær af C2-domænet iagttages dog en dosisafhængig stigning af bindingen til LRP. Dette viser, at C2-domænet i faktor VIII bindes til LRP.

Figur 7 viser bindingen af faktor VIII-C2-domænet til LRP i nærvær af ESH4.

Figur 8 viser effekten af RAP på ekspressionen af faktor VIII-A3-C1 i CHO-K1-celler.

EKSEMPLER

Eksempel I: Den lette kæde i faktor VIII har et LRP-bindingssted

Bindingen af faktor VIII og underenheder deraf til Low Density lipoprotein-receptor-beslægtet protein (LRP) undersøgtes under anvendelse af egnede bestanddele. LRP, faktor VIII, den lette kæde i faktor VIII, den tunge kæde i faktor VIII og thrombinaktiveret faktor VIII opnåedes under anvendelse af allerede etablerede fremgangsmåder (Moestrup S.K. et al., J. Biol. Chem., bind 266, 1991, side 14011-14017; Lenting P.J. et al., J. Biol. Chem., bind 269, 1994, side 7150-7155; og Curtis J.E. et al., J. Biol. Chem., bind 269, 1994, side 6246-6250).

Vekselvirkninger med LRP undersøgtes under anvendelse af overfladeplasmonresonans- (SPR) analysen på et BIAcore™2000-Biosensor-System (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sverige). LRP immobiliseredes i en koncentration på 8,3 fmol/mm^2 på en CM5-sensorchip, idet aminkoblingssættet anvendtes efter fabrikantens instruktioner (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sverige). En kontrolkanal på sensorchippen aktiveredes og blokeredes, idet aminkoblingsreagenserne anvendtes uden immmobilisering af protein.

Faktor VIII eller derivater deraf førtes i en koncentration på 100 nM over kontrolkanalen for at bedømme den uspecifikke binding og over den LRP-overtrukne kanal i 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ og 0,005% (vol./vol.) Tween-20 med en strømning på 5 ml/min i et tidsrum på 2 min. ved 25°C. Associationen mellem de forskellige proteiner og LRP er vist i figur 1 og udtrykt i resonansenheder. Den maksimale stigning af resonansenhederne for de forskellige derivater er sammenfattet i tabel I. Disse data viser, at faktor VIII, thrombinaktiveret faktor VIII og den lette kæde i faktor VIII kan intræde i vekselvirkning med LRP. Derimod kan den tunge kæde i faktor VIII ikke binde LRP. Det er derfor klart, at bindingsandelen af faktor VIII eller af thrombinaktiveret faktor VIII for LRP ligger i A3-C1-C2-regionen (rester 1690-2232).

Tabel I: Binding af faktor VIII og dens underenheder til immobiliseret LRP som påvist under anvendelse af SPR-analyse. Bindingen til LRP er udtrykt som resonansenheder og korrigeret for uspecifik binding.

Protein	Binding (resonansenheder)
Faktor VIII	262
Tung kæde i faktor VIII	0
Let kæde i faktor VIII	305
Thrombinaktiveret faktor VIII	446

Eksempel II: Associationskinetik af immobiliseret LRP og af den lette kæde i faktor VIII.

De kinetiske parametre for vekselvirkningen mellem den lette kæde i faktor VIII og immobiliseret LRP bestemtes under anvendelse af SPR-analysen på et BIAcore™2000-biosensor-system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sverige). Denne fremgangsmåde er almen kendt på dette område og er fx anvendt til den kinetiske analyse af vekselvirkninger mellem LRP og receptorassocieret protein (RAP) (Horn I, i LRP-ligand interactions: kinetics and structural requirements; pH.D.-Dissertation, 1997, side 65-106, Amsterdam Universitet). LRP immobiliseredes med en koncentration på 6,7 fmol/mm^2 på tre kanaler i en CM5-sensorchip som beskrevet i eksempel I. En kontrolkanal til bedømmelse af uspecifik binding tilvejebragtes som beskrevet i eksempel I. Forskellige koncentrationer af den lette kæde i faktor VIII (150, 175, 200, 225 og 250 nM) førtes over kontrolkanalen og over de med LRP overtrukne kanaler i 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ og 0,005% (vol./vol.) Tween 20 med en strømning på 20 ml/min. i et tidsrum på 2 min. ved 25°C, for at associeringen kan finde sted.

Derefter inkuberedes kanalerne med samme puffer ved en lignende strømning, for at dissocieringen kan finde sted. Som vist i figur 2 iagttages en dosisafhængig associerings- og dissocieringskurve.

Dataene analyseredes ved hjælp af Biacore Evaluation Software (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sverige). Dataanalysen viser, at vekselvirkningen mellem den lette kæde i faktor VIII med to klasser af bindingssteder gav den bedste overensstemmelse. Derefter beregnedes associerings- og dissocieringshastighedskonstanterne (k_{on} hhv. k_{off}) for begge bindingssteder. Disse hastighedskonstanter anvendtes efterfølgende for at få affinitetskonstanterne (K_d) for disse vekselvirkninger.

Tabel II: Hastighedskonstanter for vekselvirkningen mellem den lette kæde i faktor VIII og immobiliseret LRP. Dataanalysen henviser til vekselvirkningen af den lette kæde i faktor VIII med to klasser bindingssteder, der er repræsenteret af A og B.

Klasse	k_{on} (M^{-1} s^{-1})	k_{off} (s^{-1})	K_d (= k_{off}/k_{on}; 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

Eksempel III: Vekselvirkning mellem den lette kæde i faktor VIII og cellebundet LRP

Da den lette kæde i faktor VIII bindes effektivt til LRP i et system, hvor der anvendes rensede bestanddele, har vi undersøgt vekselvirkningen mellem den lette kæde i faktor VIII og LRP, som udtrykkes på overfladen af levende celler. For at udtrykke den lette kæde i faktor VIII, dvs. resterne 1649 til 2332 (Toole J.J. et al., Nature, bind 312, 1984, side 342-347) fremstilledes en konstruktion, som koder for faktor VIII-signalpeptidet, som er fusioneret med resterne 1649 til 2332. Denne konstruktion fremstilledes som følger. Det tidligere beskrevne plasmid pBPV-faktor VIII-dB695 (K. Mertens et al., Brit. J. Haematol., bind 85, 1993, side 133-142) benyttedes som forlæg til fremstillingen af to faktor VIII-fragmenter, hvor polymerasekædereaktionen (PCR) anvendtes. Et fragment fremstilledes, hvor der anvendtes senseprimeren A1 (5'-TTA GGA TCC ACC ACT ATG CAA ATA GAG CTC TCC-3'), som indeholdt et BamH1-genkendelsessted og en del, der kodede for de N-terminale rester af faktor VIII-signalpeptidet, og anti-senseprimeren A-1 (5'-AGT AGT ACG AGT TAT TTC ACT AAA GCA GAA TCG C-3'), der kodede for C-terminale rester af faktor VIII-signalpeptidet og N-terminale rester af den lette kæde i faktor VIII. Et andet fragment fremstilledes, hvor der anvendtes senseprimeren B1 (5'-

TTG CGA TTC TGC TTT AGT GAA ATA ACT CGT ACT AC-3'), der kodede for de C-terminale rester af faktor VIII-signalpeptidet og de N-terminale rester af den lette kæde i faktor VIII, og anti-senseprimeren B-1 (5'-ATT GCG GCC GCT CAG TAG AGG TCC TGT GCC TC-3'), der kodede for et NotI-genkendelsessted, et stopcodon og en del, der kodede for de C-terminale rester i den lette kæde i faktor VIII. I en anden reaktion benyttedes produkterne fra begge reaktioner som forlæg for konstruktionen af det resulterende fragment, betegnet faktor VIII-SPLC, hvor primerne A1 og B-1 anvendtes. Faktor VIII-SPLC bestod af et BamHI-genkendelsessted, en for faktor VIII-signalpeptidet kodende del, som var fusioneret med en for den lette kæde i faktor VIII kodende del, et stopcodon og et NotI-genkendelsessted. Faktor VIII-SPLC fordøjedes derefter med BamHI og NotI og ligeredes i ekspressionsvektoren pcDNA3,1 (Invitrogen, Leek, Holland), som fordøjedes under anvendelse af samme restriktionsenzym. Den resulterende vektor med betegnelsen pcfaktor VIII-LC transficeredes i Chinese Hamster-ovarie-K1 (CHO-K1)-celler (ATCC CCL-61), hvor der anvendes calciumphosphat-udfældning (J. Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1989, side 1637). CHO-K1-celler etableredes til ekspression af LRP konstitutivt på deres celleoverflade (D.J. FitzGerald et al., J. Cell. Biol., bind 129, 1995, side 1533-1541). Stabilt udtrykkende CHO-K1-celler opnåedes under udvælgelse med G-148 (Gibco-BRL, Breda, Holland) med en koncentration på 800 µg/ml.

CHO-K1-celler, som stabilt udtrykker den lette kæde i faktor VIII, dyrkedes i 2 fordybninger i en plade med 6 fordybninger (Nunc A/S, Roskilde, Danmark) til sammenløb. Fordybningerne vaskedes fem gange under anvendelse af Dulbeccos modificerede Eagle-medium-F12-medium (DMEM-F12) (Gibco, BRL, Breda, Holland), og der tilsattes 1 ml DMEM-F12. I en af fordybningerne tilsattes LRP-antagonisten RAP indtil en koncentration på 20 mg/ml straks og 2 og 4 timer efter vask af cellerne. Prøver udtoges indtil seks timer efter vask af cellerne og analyseredes derefter for koncentrationen af den lette kæde i faktor VIII, idet der benyttes en på dette område kendt fremgangsmåde (Lenting P.J. et al., J. Biol. Chem., bind 269, 1994, side 7150-7155). Som vist i figur 3 tiltog koncentrationen af den lette kæde i faktor VIII i mediet med tiden i fravær af RAP. I nærvær af RAP tiltager dog omfanget af stigningen af den lette kæde i faktor VIII i sammenligning med fraværet af RAP. Således er inhibieringen af LRP forbundet med en akkumulation af den lette kæde i faktor VIII i mediet. Dette viser tydeligt, at en LRP-afhængig mekanisme spiller en rolle ved celleoptagelsen af den lette kæde i faktor VIII.

Eksempel IV: Vekselvirkning mellem faktor VIII og celleoverfladeeksponeret Low Density lipoproteinreceptorbeslægtet protein

Som beskrevet i eksempel III eksisterer der en vekselvirkning mellem den lette kæde i faktor VIII og det celleoverfladeeksponerede LRP. Vi har derfor også undersøgt, om det intakte faktor VIII-protein har en vekselvirkning med celleoverfladeeksponeret LRP. En tidligere etableret muse-fibroblast-celleinie, som var stabilt transficeret til produktion af faktor VIII (Mertens K. et al., Brit. J. Haematol., bind 85, 1993, 133-142), dyrkedes i 2 fordybninger i en plade med 6 fordybninger indtil sammenløb (Nunc A/S, Roskilde, Danmark). Cellerne vaskedes fem gange under anvendelse af Iscovs modificerede Eagle-medium (IMEM) (Boehringer Ingelheim/Biowhitaker, Verviers, Belgien), og der tilsattes 1 ml IMEM. I en af fordybningerne tilsattes LRP-antagonisten RAP indtil en koncentration på 20 mg/ml straks og 2 og 4 timer efter vask af cellerne. Prøver udtoges indtil seks timer efter vask af cellerne og analyseredes derefter for faktor VIII-cofaktor-aktivitet, idet der benyttedes en allerede etableret fremgangsmåde (Mertens K. et al., Brit. J. Haematol., bind 85, 1993, 133-142). Som vist i figur 4 stiger mængden af faktor VIII-cofaktor-aktivitet i mediet med tiden i fravær af RAP. I nærvær af RAP tiltager dog omfanget af faktor VIII-stigningen i sammenligning med fraværet af RAP. Inhiberingen af LRP er således forbundet med en akkumulation af faktor VIII i mediet. Det er derfor klart, at en LRP-afhængig mekanisme spiller en rolle ved celleoptagelsen af den lette kæde i faktor VIII.

Eksempel V: Virkningen af RAP på faktor VIII-farmakokinetikken i knock-out-mus med kraftig faktor VIII-deficiens.

Genteknisk skabtes en musestamme med kraftig faktor VIII (FVIII)-deficiens ved mål-rettet brud på musefaktor VIII-genet efter Bi et al., Nature Genetics, 1995, bind 10, side 119-121. Faktor VIII-knock-out-mus skabtes derefter ved en indsættelse af et neogen i 3'-enden af exon 17 i musefaktor VIII-genet. De ramte handyr (X'Y) havde ikke påviselige faktor VIII-niveauer på <0,02 ± 0,01 E/ml, når der enten foretoges målinger med en kromogen faktor VIII-prøve, Hyland Immuno, Wien, Østrig, som for nylig beskrevet (Turecek et al., Thromb. Haemostas. Suppl., 1997, bind 769) eller ved hjælp af Antigen-ELrSA, som beskrevet i det følgende.

To ramte hemizygote hanmus (X'Y) behandledes intravenøst med en dosis på 200 E/kg kropsvægt af et rekombinant humanfaktor VIII (rhFVIII)-præparat, der stammede fra Chinese Hamster-ovarieceller, der er fremstillet som beskrevet (WO 85/01961) og formuleret farmaceutisk uden stabiliserende protein.

Under narkose blev musenes halespidser en time efter behandlingen skåret med klingen på en skalpel som beskrevet af Novak et al., Brit. J. Haematol. bind 69, 1998, S.371-378. En mængde på 50 µl blod opsamledes med kapillarrør (Ringcaps, Hirschmann, Tyskland) fra halesårene, idet kapillarrørene var overtrukket med lithium-heparin som antikoaguleringsmiddel. Kapillarrørene lukkedes og centrifugeredes for at skille blodcellerne fra plasma. Derefter åbnedes kapillarrørene, og celle- og plasma-fraktionen samledes ved en yderligere centrifugering. Endelig underkastedes plasmaprøverne faktor VIII-bestemmelse ved hjælp af faktor VIII-antigen ELISA, Test-Set IMMUNOZYM FVIII Ag, Hyland Immuno, Wien, Østrig, under anvendelse af monoklonale antifaktor VIII-antistoffer både til opfangning og til påvisning som beskrevet (Stel et al., Nature, 1983, bind 303, side 530-532; Lenting et al., J. Biol. Chem., bind 269, 1994, side 7150-7155; Leyte et al., Biochem. J., bind 263, 1989, side 187-194). De resulterende faktor VIII-værdier udtryktes som internationale enheder af human faktor VIII. Resultaterne af faktor VIII-plasmaniveauet er anført i tabellen.

To andre ramte hemizygote hanmus (X'Y) forbehandledes med rekombinant receptorassocieret protein (GST-RAP) 10 min. før behandlingen med den rekombinante humane faktor VIII med en dosis på 40 mg/kg kropsvægt. Det ved denne undersøgelse anvendte RAP, som går i vekselvirkning med LRP, opnås ved bakteriel fermentering som beskrevet af Hertz et al., (J. Biol. Chem., bind 266, 1991, side 21232-21238). Et fusionsprotein af RAP med glutathion-S-transferase udtryktes i E. coli og rensedes på glutathionagarose ved hjælp affinitetskromatografi. Det resulterende protein bestod hovedsageligt af fusionsproteinet og spaltningsprodukter af RAP og glutathion-S-transferase. Fusionsproteinet formuleredes i en injicerbar puffer, klar til indgivelse i faktor VIII-knock-out-musene. Som ved kontrolgruppen (kun behandling med faktor VIII) blev der taget blodprøver en time efter indgivelsen af rekombinant faktor VIII og under anvendelse af faktor VIII-antigen-ELISA målt for faktor VIII-aktivitet.

Resultaterne er vist i tabel III.

Tabel III

	Behandling dosis	Behandling dosis	Udvinding 1 time efter behandling
Mus nr.	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

Hos mus forbehandlet med GST-RAP var faktor VIII-niveauet mere end 200% af plasmaniveauet efter behandling med rekombinant VIII allene. Indgivelsen af LRP-antagonisten, RAP, forbedrede faktor VIII's farmakokinetik.

Eksempel VI: Identificering af LRP-bindingens potentielle exosteder i den lette kæde i faktor VIII.

En fremgangsmåde til identificering af exosteder, som muligvis spiller en rolle ved protein-protein-vekselvirkningen, er allerede etableret (J. Kyte og R.F. Doolittle, J. Mol. Biol. bind 157, 1982, side 105-132). Denne fremgangsmåde tilvejebringer et program, som fortløbende evaluerer et proteins hydrofili og hydrofobi langs dets aminosyre-sekvens. Ved fremgangsmåden anvendes en hydropatiskala, som gengiver den gennemsnitlige hydropati inden for segmenter af forudbestemt størrelse langs aminosyre-sekvensen. Hydrofile afsnit karakteriseres ved negative hydropativærdier og har sandsynligvis en orientering mod den udvendige side af et protein, som er til stede i en vandig opløsning. Denne fremgangsmåde anvendtes på den kendte sekvens af humanfaktor VIII (G.A. Vehar et al., Nature, bind 312, 1984, side 337-342; J.J. Toole et al., Nature, bind 312, 1984, 342-347), hvor der anvendes en segmentstørrelse ("vindue") på 19 rester. Af den fuldstændige sekvens af faktor VIII underkastedes regionen 1690-2332, som svarer til faktor VIII A3/C1/C2-domænet, denne analyse, og den resulterende hydropatikurve, som har en værdi på -15 som "afskåret", er vist i figur 5A og 5B.

Denne fremgangsmåde viser flere adskilte regioner med lave hydropati-værdier, som afspejler den hydrofile natur, der er forbundet med potentielle exosteder. Disse er anført som A til K (tabel IV):

Tabel IV

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

Tabel V:

Sted	Rester	Domæne
I	Phe 1785 til His 1822	A3
II	Trp 1889 til Asn 1915	A3
III	Trp 2112 til Tyr 2115	C1
IV	His 2211 til Leu 2230	C2

Af den fuldstændige sekvens af faktor VIII underkastedes regionen 1690-2332, som svarer til den lette kæde af fuldstændigt faktor VIII, igen denne analyse, og den resulterende hydropatikurve, som har en værdi af -20 som "afskæring", er vist i figur 5B. exostederne er anført som I til IV.

Eksempel VII: C2-domænet af faktor VIII indeholder et LRP-bindingssted.

A3-C1-C2-regionen af faktor VIII omfatter bindingsandelen for LRP (jfr. eksempel I). Denne region indeholder et antal potentielle LRP-bindings-exosteder i de domæner, de danner, herunder C2-domænet (jfr. eksempel VI). Til bekræftelse af, at sådanne exosteder faktisk vil kunne spille en rolle ved LRP-bindingen, analyseredes vekselvirkninger mellem LRP og C2-domænet i faktor VIII nøjere. C2-domænet i faktor VIII (dvs. resterne 2172-2332) udtryktes i insektceller under anvendelse af en allerede etableret metode (K. Fijnvandraat et al., Blood, bind 91, 1998, side 2347-2352). C2-domænet i

faktor VIII rensedes ved hjælp af immunoaffinitetskromatografi under anvendelse af det mod C2-domænet rettede monoklonale antistof CLB-CAg 117 (K.Fijnvandraat et al., Blood, bind 91, 1998, side 2347-2352). Vekselvirkningen med LRP undersøgtes under anvendelse af overfladeplasmonresonans-analysen i et BIAcore™2000-System (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sverige). LRP immobiliseredes på en CM5-sensorchip som beskrevet i eksempel I. Til forstærkning af resonanssignalet præinkuberedes C2-domænet i faktor VIII (0, 100 eller 375 nM) i nærvær af 500 nM af det mod C2-domænet rettede monoklonale antistof ESH-8 (D. Scandella et al., Blood, bind 86, 1995, side 1811-1819) i 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 0,005% (vol./vol.) Tween-20 i 15 minutter ved stuetemperatur. Derefter førtes præinkuberede prøver over kontrolkanaler til bedømmelse af den uspecifikke binding samt over den LRP-overtrukne kanal (8,3 fmol/mm^2) med en strømning på 5 ml/min i 2 minutter ved 25°C.

I fravær af C2-domænet viser ESH-8 en minimal, om overhovedet nogen binding til immobiliseret LRP. I nærvær af C2-domænet iagttoges dog en dosisafhængig stigning af bindingen til LRP (figur 6). Dette viser, at C2-domænet i faktor VIII bindes til LRP. Således har exostederne inden for den lette kæde i faktor VIII udmærket evnen til LRP-binding og dermed til at spille en rolle i den LRP-afhængige clearance af faktor VIII in vivo.

Eksempel VIII: Binding af FVIII C2-domæne i nærvær af et anti-FVIII-C2-domæne-antistof

FVIII-molekylet omfatter to steder, som er involveret i vWF-bindingen, hvor et af disse steder ligger på det carboxyterminale C2-domæne i den lette kæde i faktor VIII (Saenko og Scandella, J.B.C. 272 (1997), S.18007-18014). Da vWF-bindingen inhiberes af det på C2-domænet rettede antistof ESH4, undersøgtes denne virkning på LRP-bindingen, idet antistof-bindingslegemeundersøgelserne udførtes som i eksempel VII. Antistoffet ESH4 erhvervedes fra American Diagnostica.

Som vist i figur 7 interfererer ESH4 med bindingen af LRP til den lette kæde i faktor VIII. Denne inhibering synes at være specifik, da ESH4 ikke var i stand til at påvirke bindingen af komplekser af vævstype-plasminogenaktivator/plasminogenaktivator-inhibitor-1 til LRP. Endvidere var andre antistoffer, som var rettet mod den lette kæde i faktor VIII, nemlig CLB-CAg A og CLB-CAg 69 (Lenting et al., J.B.C. 269 (1994), S.7150-7155) ikke i stand til at interferere med LRP med henblik på bindingen til faktor VIII.

I figur 7 vises desuden faktor VIII-C2-domænets binding til LRP i nærvær af ESH4. Herved inkuberedes immobiliseret LRP (16 fmol/mm^2) med den lette kæde i faktor VIII (150 nM) i nærvær eller fravær af antistof ESH4 ved en strømning på 5 µl/min. i 2 minutter ved 25°C. Resultaterne er angivet i resonansenheder (resonansenheder: RU) og korrigeret for ikke-specifik binding, som lå på mindre end 5% over for bindingen til LRP-overtrukne kanaler.

I figur 7 er koncentrationen af ESH4-antistof vist i nM på x-aksen og den vedvarende binding af den lette kæde i faktor VIII i RU på y-aksen.

Eksempel IX: Faktor VIII A3-C1-regionen har et LRP-bindingssted

A3-C1-C2-regionen i faktor VIII omfatter bindingsandelen for LRP (jfr. eksempel I). Af den i eksempel II beskrevne kinetiske analyse fremgår klart, at der forekommer flere steder, hvor LRP'et spiller en rolle (tabel II, bindingssteder af klasse A og klasse B). Som antydet i eksempel VII bevistes forekomsten af sådanne interaktive steder for regionen i faktor VIII C2-domænet (jfr. også figur 6). Til bekræftelse af, at også andre exosteder spiller en rolle ved vekselvirkningen med LRP, analyseredes vekselvirkningen mellem LRP og faktor VIII A3-C1-regionen (dvs. faktor VIII-rester 1649 til 2172). For at få fragmentet af den lette kæde i denne faktor VIII fremstilledes en konstruktion, som koder for signalpeptidet i faktor VIII, som er smeltet sammen med resterne 1649 til 2172. Denne konstruktion fremstilledes som følger. Vektoren pcfaktor VIII-LC, som er beskrevet i eksempel III, anvendtes som konformationsskabelon til konstruktionen af et faktor VIII-fragment under anvendelse af PCR. Dette fragment produceres under anvendelse af senseprimeren A1 (5'-TTA GGA TCC ACC ACT ATG CAA ATA GAG CTC TCC-3', jfr. eksempel III) og antisenseprimeren FA2172min (5'-AAT GCG GCC GCT TCA ATT TAA ATC ACA GCC CAT-3'). Primeren FA 2172 koder for et NotI-genkendelsessted, et stopkodon og resterne 2167 til 2172 i faktor VIII. PCR-produktet spaltedes med BspMII og NotI, og et fragment på 352 basepar isoleredes og ligeredes i pcfaktor VIII-LC-vektoren, som fordøjedes under anvendelse af samme restriktionsenzymer. Den resulterende vektor, der betegnedes som pcfaktor VIII-A3C1, transficeredes på CHO-K1-celler (ATCC CCL-61) under anvendelse af kalciumphosphatudfældning (J. Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laborary Manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1989, side 1637). CHO-K1-celler, som stabilt udtrykker faktor VIII A3-C1-fragmenterne, opnåedes under udvælgelse med G-148 (Gibco-BRL, Breda, Holland) i en koncentration på 800 µg/ml.

CHO-K1-celler, der stabilt udtrykker faktor VIII A3-C1-fragmenter, anvendtes til dyrkningen i stort omfang til opnåelse af et konditioneret medium, som indeholder faktor VIII A3-C1. Faktor VIII A3-C1 rensedes ved hjælp af immunaffinitetskromatografi, hvor det tidligere beskrevne monoklonale antistof CLB-CAg A (Leyte A. et al., Biochem. J., 1989, bind 263, side 187-194) anvendtes, som er rettet mod A3-domænet i faktor VIII. Til dette formål immobiliseredes CLB-CAg A på CNBr-sefarose 4B (Pharmacia Biotech, Roosendaal, Holland) efter fabrikantens anvisninger i en koncentration på 1 mg/ml. Konditioneret medium inkuberedes med CLB-CAg A-sefarose (2 ml/l medium), og bundet faktor VIII A3-C1 elueredes i 150 mM NaCl, 55 (vol./vol.)% ethylenglykol, 25 mM lysin (pH 11). Fraktioner, som indeholdt faktor VIII A3-C1, neutraliseredes straks under anvendelse af 1/10 volumen 1 M Imidazol (pH 5,0) og dialyseredes derefter over for 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 0,005% (vol./vol.) Tween-20, 20 mM HEPES (pH 7,4).

Vekselvirkningen mellem faktor VIII A3-C1 og LRP undersøgtes under anvendelse af overfladeplasmonresonans-analyse i et BIAcore™2000-System (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sverige). LRP immobiliseredes på en CM5-sensorchip som beskrevet i eksempel I. Prøver, som indeholdt faktor VIII A3-C1 (200 nM eller 400 nM), førtes med en strømning på 5 µl/min. i 2 minutter ved 25°C gennem kontrolkanalen til bedømmelse af den ikke-specifikke binding og over den med LRP overtrukne kanal (8,3 fmol/mm^2). Den maksimale stigning af resonansenhederne for begge koncentrationer af faktor VIII A3-C1 er sammenfattet i tabel VI. I nærvær af 400 nM faktor VIII A3-C1 iagttoges en højere reaktion end ved 200 nM faktor VIII A3-C1 (59 og 47 resonansenheder). Til forbedring af bindingen af faktor VIII A3-C1 til LRP præinkuberedes faktor VIII A3-C1 (400 nM) i nærvær af 500 nM af det monoklonale antistof CLB-CAg A i 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 0,005% (vol./vol.) Tween 20 i 15 minutter ved stuetemperatur. Derefter førtes de præinkuberede prøver gennem kontrolkanalen og den med LRP overtrukne kanal med en strømning på 5 ml/min i 2 minutter ved 25°C. I nærvær af antistoffet CLB-CAg A iagttoges der faktisk en stigning i reaktionen (118 resonansenheder). Således viser disse data tydeligt, at faktor VIII A3-C1 kan indgå i vekselvirkning med LRP på en dosisafhængig måde.

Tabel VI: Binding af faktor VIII A3-C1 til immobiliseret LRP som påvist under anvendelse af SPR-analyse. Bindinger til LRP er udtrykt i resonansenheder og korrigeret for uspecifik binding.

Koncentration A3-C1	Binding (resonansenheder)
200 nM	47
400 nM	59
400 nM + 500 nM CLB-CAg A	118

Eksempel X: Vekselvirkning mellem faktor VIII A3-C1 og på celleoverfladen eksponeret Low Density lipoproteinreceptorbeslægtet protein

Som beskrevet ovenfor kan faktor VIII A3-C1 (dvs. resterne 1649 til 2172) træde i vekselvirkning med renset LRP. Vi har undersøgt vekselvirkningen yderligere mellem faktor VIII A3-C1 og LRP, som udtrykkes på overfladen af levende celler. Derfor dyrkedes CHO-K1-celler, som udtrykker faktor VIII A3-C1 stabilt (som beskrevet ovenfor), til sammenløb i 6 fordybninger i en plade med 24 fordybninger (Nunc A/S, Roskilde, Danmark). Fordybningerne vaskedes fem gange under anvendelse af DMEM-F12 (Gibco-BRL, Breda, Holland), og der tilsattes 500 µl DMEM-F12. I tre af fordybningerne tilsattes LRP-antagonisten RAP i en koncentration på 1 µM på tidspunktet 2 og 4 timer efter vask af cellerne. Prøver udtoges indtil seks timer efter vask af cellerne og analyseredes derefter for koncentrationen af faktor VIII A3-C1. Koncentrationen af faktor VIII A3-C1 bestemtes i det væsentlige under anvendelse af en på dette område beskrevet fremgangsmåde (Lenting P.J. et al., J. Biol. Chem., bind 269, 1994, side 7150-7155) bortset fra, at det monoklonale antistof CLB-CAg 12 anvendtes i stedet for CLB-CAg 117. Som vist i figur 8 steg koncentrationen af faktor VIII A3-C1 under tidsforløbet i fravær af RAP. I nærvær af RAP stiger dog omfanget af faktor VIII A3-C1 i sammenligning med fravær af RAP. Således er inhiberingen af RAP forbundet med en ansamling af faktor VIII A3-C1 i mediet. Dette viser, at en LRP-afhængig mekanisme spiller en rolle ved optagelsen af faktor VIII A3-C1 i cellen.

Figur 8 viser virkningen af LRP-antagonisten RAP på koncentrationen af faktor VIII A3-C1 i et medium af faktor VIII A3-C1 udtrykkende celler. I fravær af RAP (åbne symboler) er stigningen i faktor VIII A3-C1-mængderne mindre end i nærvær deraf (lukkede symboler). Dataene repræsenterer middelværdien ± standardafvigelse ved de tre forsøg.

Eksempel XI: Mutationer i faktor VIII-C2-domænet påvirker bindinger til LRP

Som beskrevet i eksempel VII har faktor VIII-C2-domænet et bindingssted til LRP. Vi har derfor undersøgt virkningen af mutationer i dette domæne på bindingen af faktor VIII og vekselvirkningen med LRP, som er eksponeret på overfladen af cellen. Til ekspression af faktor VIII-varianter, der har sådanne mutationer, fremstilledes to konstruktioner. Begge faktor VIII-ekspressionsplasmider var derivater af plasmidet pF8-SQ#428 (F. Scheiflinger, upublicerede resultater); et plasmid, som indeholder cDNA'erne af en B-domæne-udeladt FVIII-variant indsat i den kommercielt tilgængelige vektor pSI (Promega). Ved denne konstruktion blev alle undtagen fjorten aminosyrer fjernet fra B-domænet i FVIII (SQ-mutanter, jfr. Lind et al., Eur. J. Biochem., bind 232, 1995, side 19-27) .

Først skete en modifikation af vektoren pF8-SQ#428, idet vektoren blev skåret med EcoRV/AgeI, og ligering af de tilstødende oligonukleotider P-A/Em(1) 5'-CCGGAGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG AC-3' og P-A/Em(2) 5'-GTCTTCATAA CTGTCCTCGT AATAATCT-3'. Denne fremgangsmåde gav vektoren pF8-SQ-dA/E#501. Inde i denne vektor blev ekspressionen af FVIII-cDNA fremdrevet gennem SV40-promoteren og enhanceren. Nedstrøms, for 3'-enden af FVIII-genet, anvendes polyadenyleringsstedet af SV40 til afslutning af transskriptionen. En kimær intron indførtes, der var sammensat af 5'-donorstedet fra den første intron af det humane β-globingen og grenen og 3'-acceptorstedet fra intronen, som befinder sig mellem lederen og legemet af en variabel region i en tung kæde i et immunglobulingen, til forøgelse af mængden af genekspression (jfr. pSI, Produktinformation, Promega). Til yderligere forbedring af ekspressionsmængderne indsattes en sekvenskontekst, som viste sig at være optimal til initiering af den eukaryotiske proteintranslation ("Kozak-sekvens" 5'-GCCACCATG-3') umiddelbart opstrøms for FVIII-startkodonen (Kozak, J. Biol. Chem., bind 266, 1991, S.19867-19870). Vektoren pF8-SQ-dA/E#501 anvendtes derpå til konstruktion af vektorerne pC2-m7#516 og pC2-m9#518.

Konstruktionen af pC2-m7#516 skete ved indsættelse af de tilstødende oligonukleotider Mu(1) 5'-CGAATTCACC CCCAGATTTG GGAACACCAG ATTGCCCTGA GGCTGGAGAT TCTGGGCTGC GAGGCACAGC AGCAGTACTG AGC-3' og P-Mu(2) 5'-GGCCGCTCAG TACTGCTGCT GTGCCTCGCA GCCCAGAATC TCCAGCCTCA GGGCAATCTG GTGTTCCCAA ATCTGGGGGT GAATT-3' i den med AsuII/NotI-skårne vektor pF8-SQ-dA/E#501.

Den resulterende vektor koder for en faktor VIII-variant, som har følgende substitutioner: Ser^{2312} til Ile^{2312}, Val^{2314} til Glu^{2314}, Met^{2321} til Leu^{2321}, Val^{2323} til Ile^{2323}, Asp^{2330} til Gln^{2330} og Leu^{2331} til Gln^{2331}.

Konstruktionen af pC2-m9#518 skete ved indsættelse af de tilstødende oligonukleotider P-CC(1) 5'-CTAGAACCAC CGTTAGTGGC TCGCTACGTG CGACTGCACC CCCAGAGTTG GGCTCACCAT-3', P-CC(2) 5'-ATTGCCCTGA GGCTGGAGGT TCTGGGCTGC GATACTCAGC AGCCAGCTTG AGC-3', P-CC(3) 5'-GGCCGCTCAA GCTGGCTGCT GAGTATCGCA GC-3', P-CC(4) 5'-CCAGAACCTC CAGCCTCAGG GCAATATGGT GAGCCCAACT CTGGGGGTGC-3' og P-CC(5) 5'-AGTCGCACGT AGCGAGCCAC TAACGGTGGT T-3' i den med XbaI/NotI skårne vektor pF8-SQ-dA/E#501.

Konstruktionen af pC2-m9#518 koder for en faktor VIII-variant, som omfatter følgende aminosyresubstitutioner: Asp^{2298} til Glu^{2298}, Leu^{2302} til Val^{2302}, Thr^{2303} til Ala^{2303} og Leu^{2306} til Val^{2306}, Ile^{2308} til Leu^{2308}, Val^{2314} til Ala^{2314}, Gln^{2316} til His^{2316}, Met^{2321} til Leu^{2321}, Glu^{2327} til Asp^{2327}, Ala^{2328} til Thr^{2328}, Asp^{233} til Gln^{2330}, Leu^{2331} til Pro^{2331} og Tyr^{2332} til Ala^{2332}.

Begge vektorer, pC2-m9#518 og pC2-m7#516, som koder for faktor VIII#518 og faktor VIII#516, transficeredes i musefibroblast-C127-celler, idet der anvendtes calciumphosphatudfældning (J. Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1989, S.1637). Vektorerne cotransficeredes (forhold 20:1), hvor plasmidet pDH#310 anvendtes, hvilket muliggjorde en udvælgelse af transfektanterne med hygromycin B (200 µg/ml).

C127-celler, som udtrykker faktor VIII (jfr. eksempel IV), faktor VIII#518 og faktor VIII#516 stabilt, dyrkedes til 50% sammenløb i 4 fordybninger i en plade med 24 fordybninger (Nunc A/S, Roskilde, Danmark). Fordybningerne vaskedes fem gange under anvendelse af IMEM (Boehringer Ingelheim/ BioWhitaker, Verviers, Belgien), og 1 ml IMEM tilsattes. I to af fordybningerne for hver faktor VIII-variant tilsattes LRP-antagonisten RAP til en koncentration af 20 mg/ml straks og 2 timer efter vask af cellerne. Prøver udtoges to og tre timer efter vask af cellerne og analyseredes derpå for faktor VIII-cofaktor-aktivitet under anvendelse af en allerede etableret fremgangsmåde (Mertens K. et al., Brit. J. Haematol., bind 85, 1993, 133-142). I tabel VII er faktor VIII-ekspressionsmængderne angivet i nærvær og fravær af RAP på forskellige tidspunkter. For normal faktor VIII samt for faktor VIII-varianterne #516 og #518 iagttoges en stigning

af faktor VIII-aktiviteten i mediet i nærvær eller i fravær af RAP. For normal faktor VIII er ekspressionsmængden i nærvær af RAP dog forhøjet, hvorimod denne virkning er stærkt reduceret for faktor VIII-varianterne #516 og #518, for så vidt de overhovedet er til stede. Dette viser, at den LRP-formidlede celleoptagelse af faktor VIII-varianterne #516 og #518 forløber mindre effektivt end ved normal faktor VIII. Således gør aminosyresubstitutionerne i faktor VIII-C2-domænet, således som de er anført for faktor VIII-varianterne #516 og #518, faktor VIII mindre følsom over for en med LRP formidlet celleoptagelse.

Tabel VII: Ekspressionsmængderne af normal faktor VIII og faktor VIII-varianterne #516 og #518 i nærvær og fravær af RAP. Dataene repræsenterer ±-middelværdien af to uafhængige forsøg.

Faktor VIII	Tid (timer)	Ekspression (E/L)		Forhold
		-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

SEKVENSPROTOKOL ANNEKS

<110> Baxter AG

<120> Et faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet

<130> R 36089

<140> PCT/AT99/00272
<141> 1999-11-10

<150> A 1872/98
<151> 1998-11-10

<160> 14

<170> PatentIn version 2.1

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:primer

<400> 1
ttaggatcca ccactatgca aatagagctc tcc 33

<210> 2
<211> 34
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:primer

<400> 2

agtagtacga gttatttcac taaagcagaa tcgc 34

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:primer

<400> 3

ttgcgattct gctttagtga ataactcgt actac 35

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:primer

<400> 4

attgcggccg ctcagtagag gtcctgtgcc tc 32

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:primer

<400> 5

aatgcggccg cttcaattta aatcacagcc cat 33

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 6

ccggagatta ttacgaggac agttatgaag ac 32

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 7

gtcttcataa ctgtcctcgt aataatct 28

<210> 8
<211> 83
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 8

<210> 9
<211> 85
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 9

<210> 10
<211> 60
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 10

ctagaaccac cgttagtggc tcgctacgtg cgactgcacc cccagagttg ggctcaccat 60

<210> 11
<211> 53
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 11

attgccctga ggctggaggt tctgggctgc gatactcagc agccagcttg agc 53

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 12
ggccgctcaa gctggctgct gagtatcgca gc 32

<210> 13
<211> 50
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 13
ccagaacctc agcctcagg gcaatatggt gagcccaact ctgggggtgc 50

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Kunstig sekvens

<220>
<223> Beskrivelse af den kunstige sekvens:oligonukleotid

<400> 14
agtcgcacgt agcgagccac taacggtggt t 31

PATENTKRAV

1. Humant faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet, som har en modifikation mellem AS 1784 (Ser) og 1831 (Asp), og/eller AS 2108 (Asp) og 2118 (Asn), idet modifikationen er en mutation, udeladelse eller indsættelse, som nedsætter bindingsaffiniteten til det Low Density lipoprotein-receptorbeslægtede protein (LRP).

2. Faktor VIII-polypeptid ifølge krav 1, **kendetegnet ved, at** modifikationen findes mellem AS 2108 (Asp) og 2118 (Asn).

3. Faktor VIII-polypeptid ifølge krav 2, **kendetegnet ved, at** modifikationen findes mellem AS 2112 (Trp) og 2115 (Tyr).

4. DNA-molekyle, som koder for et faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3.

5. Ekspressionsvektor, som har et DNA-molekyle ifølge krav 4.

6. Transformeret celle og afkom deraf, som har et DNA-molekyle ifølge krav 4 eller en ekspressionsvektor ifølge krav 5.

7. Fremgangsmåde til fremstilling af et faktor VIII-polypeptid med faktor VIII:C-aktivitet ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3, hvilken fremgangsmåde omfatter følgende trin:

   • dyrkning af en værtscelle i et næringsmedium, hvor værtscellen har en ekspressionsvektor, der i transskriptionsretningen indeholder en transskriptionsreguleringsregion og en translationsinitieringsregion, som virker i en værtscelle,

   en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid som defineret i et af kravene 1 til 3, og

   translations- og transskriptionstermineringsregioner, der virker i værtscellen, idet ekspressionen af DNA-sekvensen reguleres af initierings- og termineringsregionerne, og

   • isolering af polypeptidet.

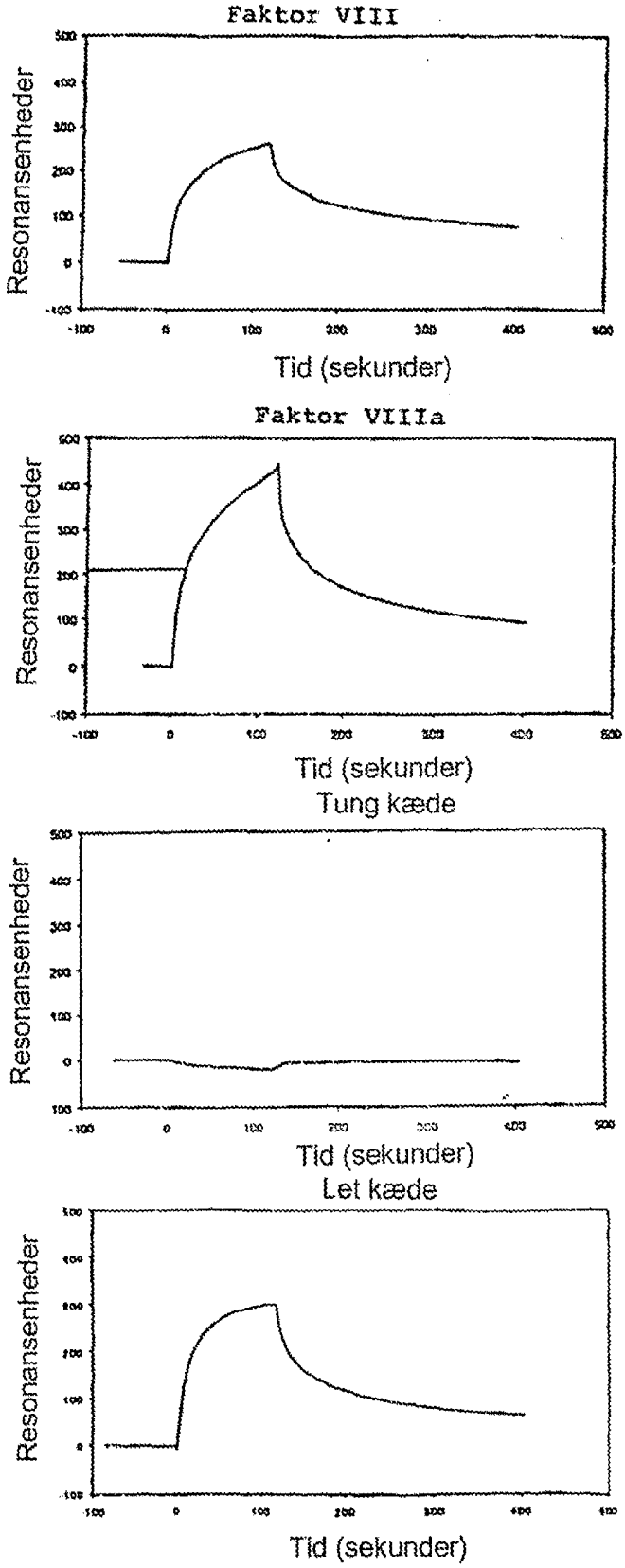
8. Præparat, som har et FVIII-molekyle med FVIII:C-aktivitet ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3 og et polypeptid valgt fra gruppen af LRP-antagonister.

9. Præparat ifølge krav 8, **kendetegnet ved, at** LRP-antagonisten er valgt fra gruppen af RAP og opløselige fragmenter af LRP, som udviser en bindingsaffinitet til FVIII-LRP-bindingsstedet.

10. Anvendelse af et faktor VIII-polypeptid ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3 eller et præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 8 eller 9 til formulering af et præparat til behandling af en koagulationsforstyrrelse.

11. Anvendelse af et præparat ifølge krav 10, idet koagulationsforstyrrelsen er hæmofili A.

FIG. 1


Faktor VIII
Resonansenheder
Tid (sekunder)
Faktor VIIIa
Resonansenheder
Tid (sekunder)
Tung kæde
Resonansenheder
Tid (sekunder)
Let kæde
Resonansenheder
Tid (sekunder)

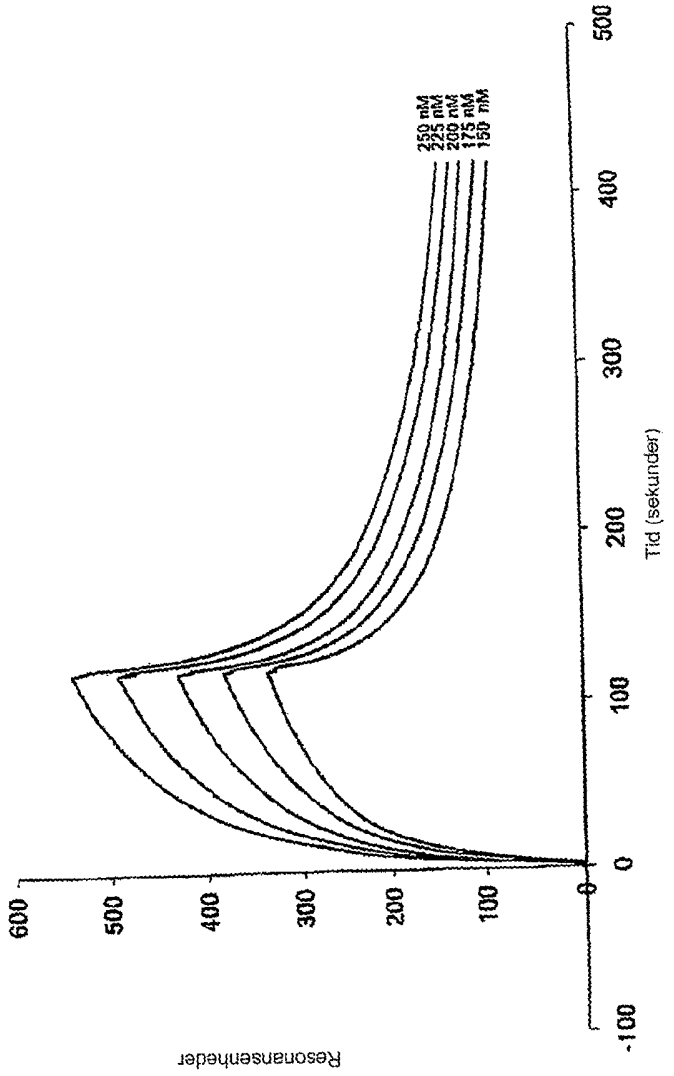

250 nM
225 nM
200 nM
175 nM
150 nM
600
500
400
300
200
100
0
-100
0
100
200
300
400
500
Tid (sekunder)
Resonansenheder

FIG. 2

FIG. 3

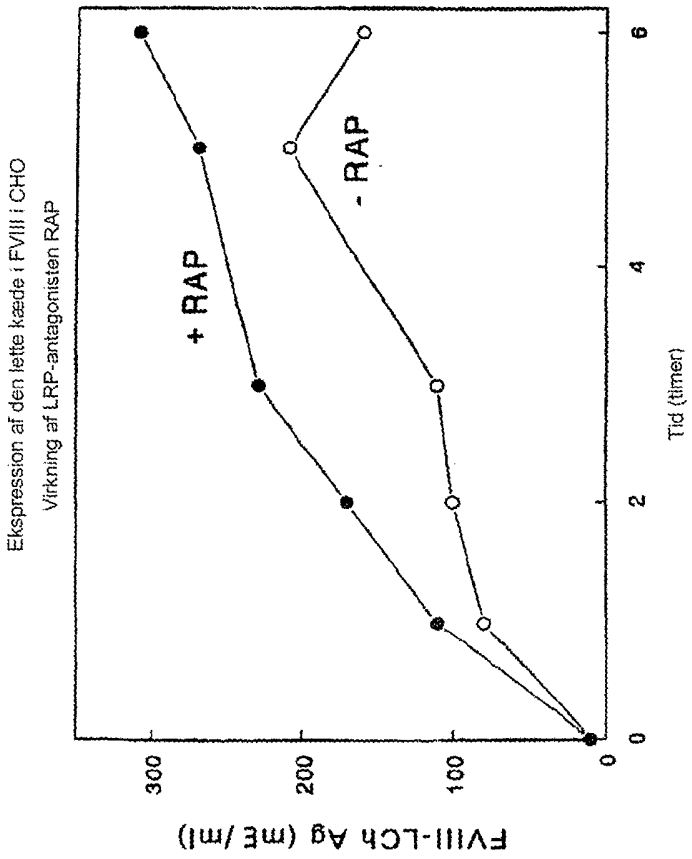

Ekspression af den lette kæde i FVIII i CHO
Virkning af LRP-antagonisten RAP
+ RAP
- RAP
FVIII-LCh Ag (mE /ml)
300
200
100
0
0
2
4
6
Tid (timer)

FIG. 4

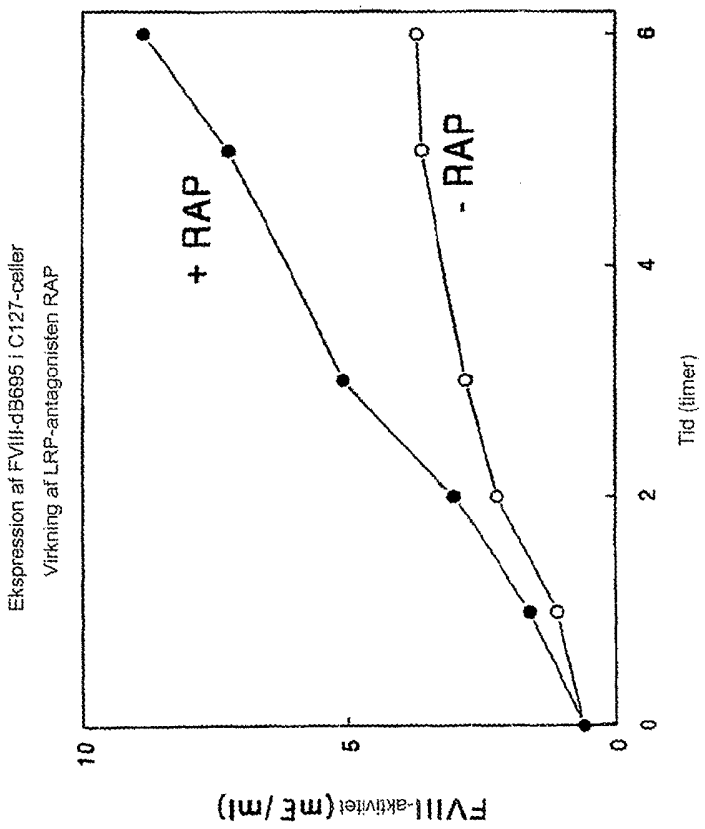

Ekspression af FVIII-dB695 i C127-celler
Virkning af LRP-antagonisten RAP
+ RAP
- RAP
FVIII-aktivitet (mE/ml)
Tid (timer)
0
5
10
0
2
4
6

FIG. 5A

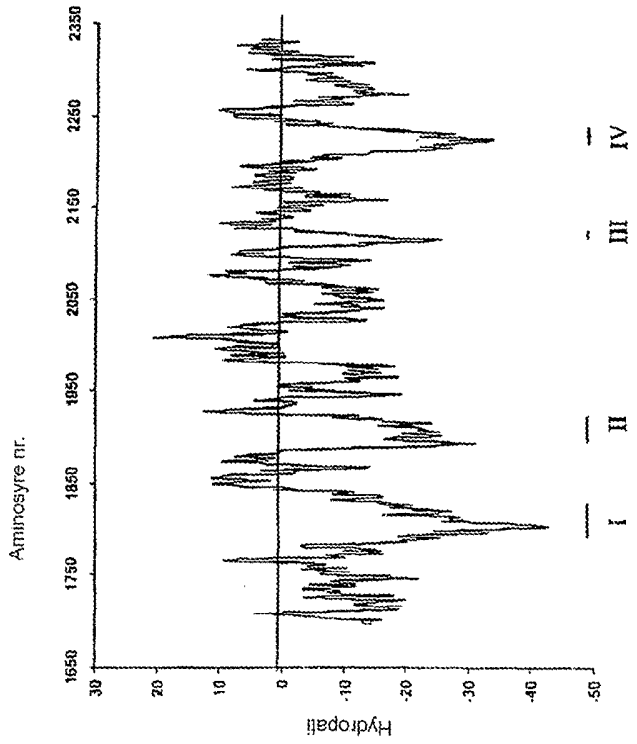

Aminosyre nr.
1650
1750
1850
1950
2050
2150
2250
2350
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
Hydropati
I
II
III
IV

FIG. 5B

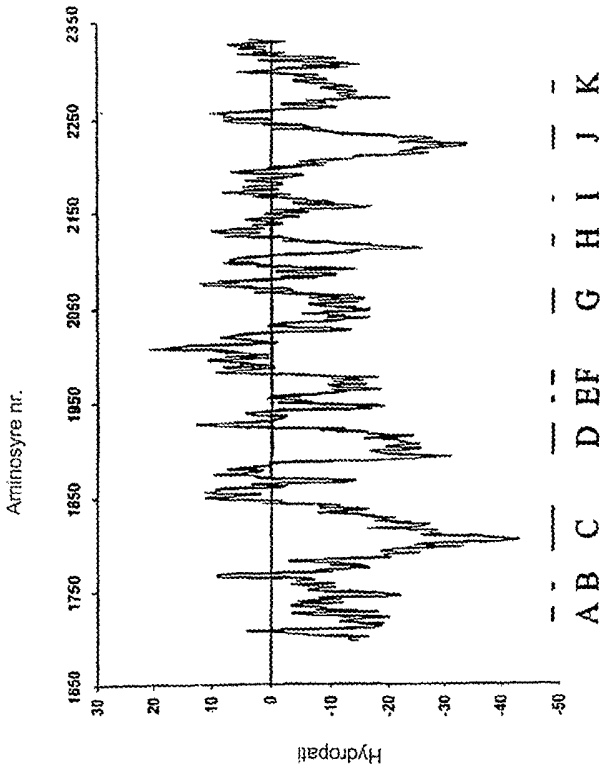

Aminosyre nr.
1650
1750
1850
1950
2050
2150
2250
2350
Hydropati
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
A B C D E F G H I J K

FIG. 6

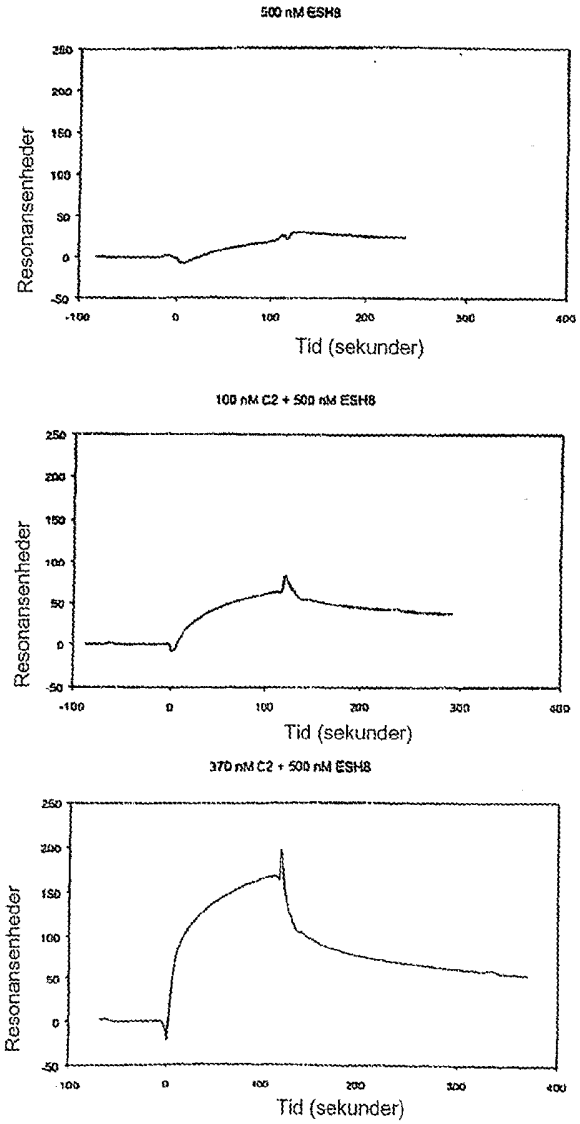

500 nM ESH8
Resonansenheder
Tid (sekunder)
100 nM C2 + 500 nM ESH8
Resonansenheder
Tid (sekunder)
370 nM C2 + 500 nM ESH8
Resonansenheder
Tid (sekunder)

Fig. 7

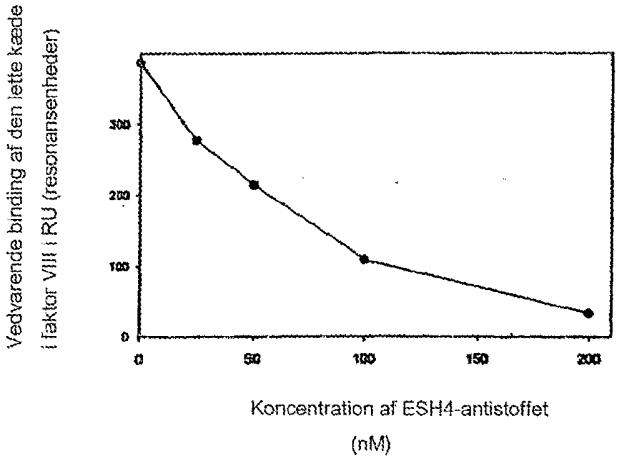
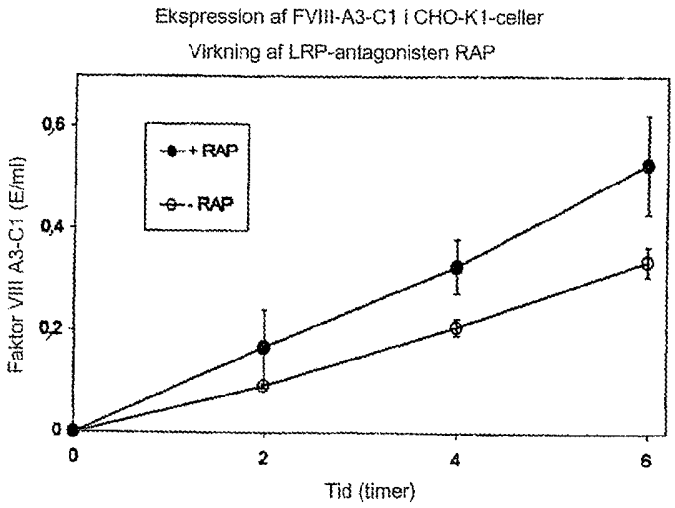

Vedvarende binding af den lette kæde
i faktor VIII i RU (resonansenheder)
300
200
100
0
0
50
100
150
200
Koncentration af ESH4-antistoffet
(nM)

FIG.8


Ekspression af FVIII-A3-C1 i CHO-K1-celler
Virkning af LRP-antagonisten RAP
+ RAP
- RAP
Faktor VIII A3-C1 (E/ml)
0,6
0,4
0,2
0
0
2
4
6
Tid (timer)