



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 783**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99921292 .1**

96 Fecha de presentación : **07.05.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1095143**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2001**

54

Título: **Inhibidor para el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con hemofilia A.**

30

Prioridad: **08.05.1998 EP 98201543**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73

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

72

Inventor/es: **Voorberg, Johannes, Jacobus;
Van den Brink, Edward, Norbert y
Turenhout, Ellen, Anne, Maria**

74

Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 313 783 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

Inhibidor para el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con hemofilia A.

5 Campo de la invención

La presente invención se enmarca en los campos del diagnóstico y del tratamiento médico. Más en particular, la presente invención da a conocer medios y procedimientos para el diagnóstico de la presencia de anticuerpos inhibidores dirigidos contra el factor VIII en la sangre de los humanos, y da a conocer medios, composiciones farmacéuticas y procedimientos para el tratamiento de humanos en los que aparezcan dichos anticuerpos inhibidores.

Antecedentes de la invención

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico ligado al cromosoma X, caracterizado por la ausencia funcional del factor VIII de la coagulación sanguínea. Dependiendo de la actividad residual del factor VIII en el plasma del paciente, la hemofilia A se puede clasificar como grave (factor VIII < 1%), moderada (factor VIII 1-5%) o leve (>5%). Los episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A se pueden controlar de forma eficaz mediante la administración intravenosa de concentrados del factor VIII purificados. Estos concentrados del factor VIII pueden obtenerse a partir de mezclas de plasma humano. De forma alternativa, se puede utilizar factor VIII recombinante producido mediante células eucariotas modificadas mediante ingeniería genética como material de partida para la preparación de concentrados del factor VIII.

Una importante complicación del tratamiento actual de la hemofilia A consiste en el desarrollo de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el factor VIII. Estos anticuerpos, denominados comúnmente inhibidores del factor VIII, aparecen en aproximadamente el 25% de los pacientes aquejados de hemofilia A grave, por lo general tras 5-20 días de exposición (Ehrenforth y otros, 1992, Lancet 339: 594-598). En los pacientes aquejados con hemofilia A moderada y leve, los anticuerpos contra el factor VIII aparecen con menor frecuencia, y esto se debe, muy probablemente, a la inducción de tolerancia por parte del factor VIII endógeno presente en el plasma de este grupo de pacientes (McMillan y otros, 1988, Blood 71: 344-348). Los anticuerpos contra el factor VIII se pueden desarrollar, con baja frecuencia, en personas sanas.

El diagnóstico de los inhibidores del factor VIII se lleva a cabo habitualmente mediante el denominado ensayo Bethesda (Kasper y otros, 1975, Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 869-872). En este ensayo, se incuban cantidades iguales de plasma normal y diluciones de plasma con inhibidor durante dos horas a 37°C. Seguidamente, se determina la actividad residual del factor VIII y se compara con una incubación de control, en la que se incubaba plasma normal con imidazol 0,1 M durante 2 horas a 37°C. La cantidad de inhibidor se expresa en unidades Bethesda; una unidad Bethesda corresponde a la cantidad de inhibidor que es capaz de reducir un 50% la actividad del factor VIII en el plasma normal. Un estudio reciente ha propuesto diversas adaptaciones al sistema de ensayo original, que sirven para mejorar la estabilidad del factor VIII durante el ensayo (Verbruggen y otros, 1995, Thromb. Haemostas. 73: 247-251). Esto se denomina la "modificación Nijmegen" del ensayo Bethesda, y resulta particularmente útil para la detección de inhibidores del factor VIII de bajo título. Es necesario indicar que el ensayo Bethesda no aporta información sobre los epítomos de los anticuerpos inhibidores del factor VIII.

La aparición de los anticuerpos inhibidores del factor VIII hace que la terapia de sustitución del factor VIII resulte inadecuada. Los médicos disponen de varias opciones de tratamiento. Los inhibidores presentes en bajo título (hasta 5-10 UB/ml) se suelen tratar mediante infusión de altas dosis de factor VIII. Un subconjunto de inhibidores del factor VIII no presenta reacción cruzada con el factor VIII porcino. El factor VIII porcino se ha utilizado para el tratamiento de los pacientes que presentan un inhibidor. La administración del factor VIII porcino puede provocar efectos secundarios. Tras el tratamiento múltiple, el 30-50% de los pacientes desarrollan anticuerpos que neutralizan la actividad del factor VIII porcino administrado.

Un tratamiento alternativo de los pacientes con inhibidor del factor VIII comprende el uso de agentes de "bypass" del factor VIII. Los concentrados de complejo protrombínico activado (APCC) se han utilizado para eludir la actividad del factor VIII. Los APCC se han utilizado con éxito para controlar los episodios hemorrágicos en un amplio número de pacientes que presentan un inhibidor. No obstante, el tratamiento no resulta eficaz en todos los casos, y en una serie de pacientes se han documentado aumentos anamnésicos del título del inhibidor tras la administración de APCC (debidos, muy probablemente, a cantidades traza de factor VIII en la preparación). En los últimos 5 años, se ha desarrollado el factor VIIa recombinante como nuevo agente de "bypass" del factor VIII para el tratamiento de pacientes que presentan un inhibidor (Lusher y otros, 1996, Haemostasis [Haemostasia] 26 (suppl. 1): 124-130). El factor VIIa recombinante se han utilizado con éxito para controlar los episodios hemorrágicos en pacientes que presentan un inhibidor. No obstante, el tratamiento con este agente está limitado por la corta vida media de este compuesto en la circulación, lo que requiere realizar infusiones múltiples en intervalos relativamente cortos. El factor V resistente a APC se ha sugerido recientemente como medio alternativo para eludir la actividad biológica de los inhibidores del factor VIII (WO 95/29259). Los agentes descritos anteriormente no actúan directamente como inhibidores del factor VIII, sino que sirven meramente para eludir el factor VIII mediante infusión de grandes cantidades de concentrados de factor de coagulación con mayor actividad procoagulante.

Se han propuesto otros métodos de neutralización del inhibidor, pero no se ha demostrado su eficacia de manera convincente. Se han propuesto las preparaciones de inmunoglobulina derivadas de plasma de donantes sanos como supresoras activas de los inhibidores del factor VIII (Sultan y otros. 1984, Lancet 333, 765-768). Sultan 1997, Blood Coagulation and Fibrinolysis [Coagulación sanguínea y fibrinólisis] Vol 8, S15-S18. A pesar del éxito observado en pacientes con hemofilia A adquirida e inhibidores con alto título, las preparaciones de inmunoglobulina no se aplican de forma universal para el tratamiento de pacientes que presentan un inhibidor. Los efectos beneficiosos de las preparaciones de inmunoglobulina en estos pacientes se han atribuido a la presencia de anticuerpos antiidiotípicos que neutralizan la actividad de los inhibidores del factor VIII. De hecho, en algunos pacientes, el descenso del nivel de los inhibidores del factor VIII coincidió con la aparición de anticuerpos antiidiotípicos (Sultan y otros. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 828-831). Algunos investigadores han defendido con intensidad el control mediante anticuerpos antiidiotípicos de los inhibidores del factor VIII en pacientes con hemofilia A y en personas sanas (Gilles y otros. 1996, J. Clin. Inv. 97: 1382-1388). El mismo grupo ha propuesto que la infusión de complejos antígeno-anticuerpo a pacientes que presenten inhibidores puede acelerar la reducción de los anticuerpos contra el factor VIII (Patente U.S.A. n° 5.543.145). Se ha propuesto que este descenso está mediado por un aumento en el número de anticuerpos antiidiotípicos inducido por los complejos antígeno-anticuerpo infundidos. El anticuerpo específico contra el factor VIII utilizado en este protocolo de tratamiento se obtiene a partir de plasma de pacientes que presentan un inhibidor. Obviamente, esta preparación presenta una mezcla heterogénea de anticuerpos y no se dispone de detalles con respecto a la especificidad epitópica de estos anticuerpos. Asimismo, no se ha dado a conocer la estructura primaria de los anticuerpos de estas preparaciones antígeno-anticuerpo.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento de anticuerpos inhibidores dirigidos contra el factor VIII. Se han dado a conocer procedimientos que muestran cómo llegar a secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que codifican para anticuerpos específicos contra el factor VIII. La presente invención da a conocer pruebas diagnósticas que permiten detectar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que codifican para anticuerpos específicos contra el factor VIII dentro de una mezcla heterogénea de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que codifican para anticuerpos. La presente invención da a conocer, además, la forma de utilizar fragmentos de anticuerpos recombinantes que se unen específicamente al factor VIII como nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de pacientes que presenten inhibidores del factor VIII.

Se da a conocer un polipéptido que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de EL-14 o IT-2 representadas en la figura 4A, siendo dicho polipéptido capaz de neutralizar la actividad inhibidora de los anticuerpos inhibidores del factor VIII, sin interferir con la actividad procoagulante del factor VIII.

También se da a conocer un polinucleótido que codifica para un polipéptido de la presente invención.

Además, la presente invención da a conocer un procedimiento para la producción de un polipéptido recombinante de la presente invención, que comprende la preparación de un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido, la preparación de un vector recombinante que contiene dicho polinucleótido unido de forma funcional a una secuencia de control capaz de promover la expresión del polinucleótido por parte de una célula huésped, la transformación de una célula huésped mediante dicho vector recombinante, el cultivo de dicha célula huésped en condiciones que promuevan la expresión del polinucleótido y, de forma opcional, el aislamiento del polipéptido producido de este modo.

La presente invención da a conocer además una composición farmacéutica para el tratamiento de la inhibición del factor VIII en un humano, que comprende un polipéptido, según lo definido anteriormente, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. De forma opcional, la composición también contiene factor VIII;

La presente invención también da a conocer un procedimiento para el tratamiento de la inhibición del factor VIII en un humano, que comprende la administración (de una cantidad eficaz para reducir o evitar dicha inhibición del factor VIII) de un polipéptido, según se define en la presente invención, opcionalmente junto con factor VIII o un sustituto del factor VIII.

En la técnica anterior no se dan a conocer ni se sugieren polipéptidos según la presente invención, que sean capaces de neutralizar la actividad inhibidora de los anticuerpos inhibidores del factor VIII sin interferir con la actividad del factor VIII.

La patente WO 93/12232 se refiere a un anticuerpo monoclonal recombinante que se une a la glucoproteína gp120 del VIH y que bloquea la unión de gp120 al receptor CD4. Este documento no hace referencia a los anticuerpos contra el factor VIII.

Gilles y otros. (Blood Vol. 82, 1993, pp 2452-2461) dan a conocer anticuerpos contra el factor VIII de pacientes hemofílicos. No se mencionan los polipéptidos que comprendan la secuencia de EL-14 o IT-2, y que presente la combinación única de propiedades ventajosas, según se describe en la presente invención.

La patente WO 96/05860 da a conocer un procedimiento para prevenir o reducir la formación de anticuerpos inhibidores del factor VIII en pacientes con hemofilia A. Este procedimiento comprende la administración de una formulación de inmunoglobulinas antes o durante el tratamiento inicial con factor VIII. La formulación de immuno-

ES 2 313 783 T3

globulinas puede ser un concentrado preparado a partir de plasma obtenido de donantes normales. La patente WO 96/05860 no explica ni sugiere un polipéptido que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de EL-14 o IT-2 representado en la figura 4A, según se da a conocer en la presente invención.

- 5 Hoyer (American Journal of Medicine 1991, Vol. 91, páginas 405-445) resume varias estrategias para el tratamiento de pacientes que presenten inhibidores del factor VIII adquiridos. No se mencionan los polipéptidos según la presente invención, que sean capaces de neutralizar la actividad inhibitora de los anticuerpos inhibidores del factor VIII sin interferir con la actividad del factor VIII.
- 10 Fijnvandraat y otros. (Blood, Vol. 91, 1998, pp. 2347-2352) describen la caracterización de los anticuerpos presentes en pacientes con hemofilia A tratados con factor VIII. Los anticuerpos descritos se unen predominantemente a regiones específicas, incluidas la región C2 y A3. Se menciona que se puede utilizar la administración de péptidos sintéticos que se solapan con epítomos de los inhibidores para resolver el problema de los inhibidores del factor VIII. En el documento, no se da a conocer ni se sugiere la solución dada a conocer en la presente invención, a saber, la
- 15 selección de fragmentos de anticuerpo con capacidad para unirse al factor VIII y bloquear los inhibidores del factor VIII, pero sin interferir con la actividad procoagulante del factor VIII.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La figura 1 muestra la especificidad por la cadena ligera de 12 clones obtenidos tras cuatro rondas de cribado de la colección específica de IgG4 descrita en el ejemplo 2. Se incubaron fagos que expresan anticuerpos recombinantes en micropocillos que contenían la cadena ligera del factor VIII (barras negras; +80K). Para corregir la unión de fondo, también se incubaron fagos en micropocillos que no contenían la cadena ligera del factor VIII (barras grises; -80K). En el eje Y, se representa la DO (450-540 nm). Dos clones (c) expresan fragmentos de anticuerpo que no se unen
- 25 específicamente a la cadena ligera del factor VIII.

- La figura 2 muestra la especificidad por la cadena ligera de 12 clones elegidos aleatoriamente tras la primera ronda de cribado de la colección específica de IgG4 descrita en el ejemplo 2. Los clones 7, 8 y 10 expresan fragmentos de anticuerpo con especificidad por la cadena ligera del factor VIII. Los demás clones no se unen específicamente a la
- 30 cadena ligera del factor VIII. Sólo se observa una unión de fondo del fago a los micropocillos (barras grises). Dos clones (c) expresan fragmentos de anticuerpo que no se unen específicamente a la cadena ligera del factor VIII.

- La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos del clon EL 14 y del clon IT2. La secuencia de nucleótidos de ambos clones se alinea con la secuencia de nucleótidos de las secuencias de estirpe bacteriana DP-10 (para EL14) y DP-14 (para IT2). Las distintas regiones de la parte variable de la cadena pesada se indican en el siguiente orden: región
- 35 estructural 1, CDR1, región estructural 2, CDR2, región estructural 3, CDR3 y región estructural 4. La homología de los clones EL14 y IT2 con las secuencias de estirpe bacteriana DP-10 y DP-14 se indica mediante barras horizontales (-). Las diferencias vienen indicadas por los nucleótidos que aparecen en las secuencias de estirpe bacteriana DP-10 y DP-14. Obsérvese que tanto CDR3 como la región estructural 4 no se derivan de las secuencias de estirpe bacteriana DP-10 y DP-14. Consecuentemente, no se indica homología para esta parte de la secuencia de nucleótidos.
- 40

- La figura 4A representa la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de nucleótidos del clon el 14 y IT2. En las líneas inferiores se indican las desviaciones de la secuencia de aminoácidos de los segmentos de estirpe bacteriana DP-10 y DP-14. La región estructural se abrevia como "FR" (del inglés *framework*).
- 45

- La figura 4B compara la secuencia de aminoácidos de tres clones relacionados derivados del segmento de estirpe bacteriana DP-14. La secuencia de aminoácidos del clon IT2, del clon EL5 y del clon E25 se compara con la del segmento de estirpe bacteriana DP-14. Se indican las desviaciones de la secuencia de aminoácidos para cada clon. Obsérvese que los tres clones distintos comparten algunas sustituciones de aminoácidos.
- 50

- La figura 4C compara las secuencias de aminoácidos del tercer dominio variable (CDR3) de la cadena pesada del clon EL14 y IT2. Los residuos de aminoácidos homólogos están indicados por las líneas verticales. Los puntos denotan aminoácidos relacionados con la carga o la hidrofobicidad.
- 55

- La figura 5 muestra la especificidad de unión de scFv-EL14 y scFv-IT2 a la cadena ligera del factor VIII evaluada mediante los anticuerpos monoclonales murinos CLB-CAg A y CLB-CAg 117. ScFv-EL14 se une específicamente a la cadena ligera del factor VIII cuando se utiliza CLB-CAg A (80K/Apo) marcado con peroxidasa como anticuerpo
- 60 indicador (barras con tramas). De igual forma, scFv-IT2 se une a la cadena ligera del factor VIII en estas condiciones (barras con tramas). Por el contrario, cuando se utiliza CLB-CAg 117 (80K/117po) marcado con peroxidasa como anticuerpo indicador, se reduce en gran medida la unión de scFv-EL 14 y scFv-IT2 (barras negras). No se observa unión en ausencia de la cadena ligera del factor VIII (-/117po; -/Apo). El clon 04 no se une al factor VIII en estas condiciones experimentales. Estos experimentos muestran que los epítomos de scFv-EL 14 y scFv-IT2 se solapan con el de CLB-CAg 117. En el eje Y, se representa la DO (450-540 nm) de la absorbancia. En el eje X, se representan
- 65 scFv-EL14, scFv-IT2 y scFv-O4.

La figura 6 muestra la unión de diferentes diluciones de scFv-EL14 (círculos abiertos), scFv-IT2 (círculos cerrados) y scFv-O4 (control negativo) purificados. En el eje X, se indican las distintas concentraciones de las proteínas analizadas ($\mu\text{g/ml}$) en el eje Y se representa la DO (450-540 nm) de la absorbancia. El clon scFv-O4 no se une a la

ES 2 313 783 T3

cadena ligera del factor VIII en las concentraciones de proteínas evaluadas en este experimento. Tanto scFv-IT2 como scFv-EL14 se unen específicamente a la cadena ligera del factor VIII. ScFv-EL14 se une con mayor afinidad a la cadena ligera del factor VIII, en comparación con scFv-IT2.

5 La figura 7A muestra la neutralización de la actividad inhibidora del anticuerpo monoclonal murino CLB-CAg 117 por scFv-EL14. El anticuerpo CLB-CAg 117 se diluyó hasta un valor de 2 UB/ml, que corresponde a una actividad residual del factor VIII de aproximadamente 25%. Mayores cantidades de scFv-EL14 fueron capaces de neutralizar la actividad inhibidora de CLB-CAg 117 (círculos cerrados). Una concentración de 0,75 $\mu\text{g/ml}$ es suficiente para devolver la actividad del factor VIII a su nivel original. ScFv-EL14 no afectó a la actividad inhibidora del anticuerpo monoclonal murino CLB-CAg A. En el eje Y, se representa la actividad residual del factor VIII. En el eje X, se representa la cantidad de scFv añadido en $\mu\text{g/ml}$.

15 La figura 7B muestra la neutralización de la actividad inhibidora de CLB-CAg 117 por scFv-IT2 (círculos cerrados). Se necesita una concentración de 65 $\mu\text{g/ml}$ para devolver la actividad del factor VIII a su nivel original. ScFv-IT2 no afectó a la actividad inhibidora de CLB-CAg A (barras abiertas). En el eje Y, se representa la actividad residual del factor VIII. En el eje X, se representa la cantidad de scFv añadido en $\mu\text{g/ml}$.

20 La figura 8A muestra la especificidad epitópica de 15 clones obtenidos tras cuatro rondas de cribado de la colección específica de IgG4 descrita en el ejemplo 8. El cribado se llevó a cabo utilizando factor VIII inmovilizado en inmunotubos. Se incubaron fagos que expresan anticuerpos recombinantes en micropocillos que contenían la cadena ligera del factor VIII (barras negras) o el dominio A3-C1 (barras con tramas). Para corregir la unión de fondo, también se incubaron fagos en micropocillos que no contenían la cadena ligera del factor VIII o el dominio A3-C1 (barras blancas). En el eje Y, se representa la DO (450-540 nm).

25 La figura 8B muestra la especificidad epitópica de 15 clones obtenidos tras cuatro rondas de cribado de la colección específica de IgG4 descrita en el ejemplo 8. El cribado se realizó utilizando una cadena ligera del factor VIII que se había inmovilizado sobre micropocillos empleando CLB-CAg 117. Se incubaron fagos que expresan anticuerpos recombinantes en micropocillos que contenían la cadena ligera del factor VIII (barras negras) o el dominio A3-C1 (barras con tramas). Para corregir la unión de fondo, también se incubaron fagos en micropocillos que no contenían la cadena ligera del factor VIII o el dominio A3-C1 (barras blancas). En el eje Y, se representa la DO (450-540 nm).

35 La figura 9A muestra la secuencia de aminoácidos deducida de los fragmentos de anticuerpos recombinantes específicos del dominio A3-C1. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de los segmentos de genes de la cadena pesada variable de estirpe bacteriana DP15, DP31, DP49 y DP77. Se indican las desviaciones de la secuencia de aminoácidos de estos segmentos de genes de estirpe celular para cada clon B38, B 18, B35 y B04. Asimismo, se indica el aminoácido de CDR3 y FR4 de los anticuerpos recombinantes específicos de A3-C1 codificados por el clon B38, B18, B35 y B04.

40 Las figuras 9B-E indican las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del clon B38, B 18, B35 y B04.

45 La figura 10A muestra la especificidad epitópica de 20 clones obtenidos tras cuatro rondas de cribado de la colección específica de IgG4 descrita en el ejemplo 9. El cribado se realizó utilizando una cadena pesada del factor VIII (90K+) que se había inmovilizado sobre micropocillos empleando CLB-CAg 9. Se incubaron fagos que expresan anticuerpos recombinantes en micropocillos que contenían la cadena pesada del factor VIII que se inmovilizaron utilizando el Anticuerpo monoclonal contra la cadena pesada ESH5 (barras negras). Para corregir la unión de fondo, también se incubaron fagos en micropocillos que no contenían la cadena pesada del factor VIII (barras blancas). En el eje Y, se representa la DO (450-540 nm).

50 La figura 10B muestra la especificidad epitópica de 20 clones obtenidos tras cuatro rondas de cribado de la colección específica de IgG4 descrita en el ejemplo 9. El cribado se realizó utilizando una cadena pesada del factor VIII (90K+) que se había inmovilizado sobre inmunotubos. Se incubaron fagos que expresan anticuerpos recombinantes en micropocillos que contenían la cadena pesada del factor VIII que se inmovilizaron utilizando el Anticuerpo monoclonal contra la cadena pesada ESH5 (barras negras). Para corregir la unión de fondo, también se incubaron fagos en micropocillos que no contenían la cadena pesada del factor VIII (barras blancas). En el eje Y, se representa la DO (450-540 nm).

60 La figura 11A muestra la secuencia de aminoácidos deducida de los fragmentos de anticuerpos recombinantes específicos de la cadena pesada del factor VIII. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de los segmentos de genes de la cadena pesada variable de estirpe bacteriana DP10 y DP47. Se indican las desviaciones de la secuencia de aminoácidos de estos segmentos de genes de estirpe celular para dos clones que codifican para anticuerpos recombinantes que se unen a la cadena pesada del factor VIII. Asimismo, se indica el aminoácido de CDR3 y FR4 de los anticuerpos recombinantes específicos de la cadena pesada del factor VIII codificados por los dos clones.

65 Las figuras 11B y C indican las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de dos clones que codifican para anticuerpos recombinantes que se unen específicamente a la cadena pesada del factor VIII.

Descripción detallada de la invención

Varios investigadores han abordado la especificidad epitópica y el modo de acción de los anticuerpos inhibidores del factor VIII. La clonación molecular del ADNc del factor VIII reveló que el factor VIII consta de una serie de dominios repetidos que aparecen en el orden A1-A2-B-A3-C1-C2. En el plasma, el factor VIII circula en forma de un heterodímero que consiste en una cadena pesada de longitud variable (90-220 kDa) y una cadena ligera de 80 kDa. La cadena ligera del factor VIII consta de los dominios A3-C1-C2, mientras que la cadena pesada del factor VIII comprende los dominios A1-A2-B. La heterogeneidad de la cadena pesada del factor VIII tiene su origen en la limitada proteólisis que se produce dentro del dominio B, que contiene varios sitios que son sensibles a la degradación proteolítica. En el plasma, el factor VIII circula formando un complejo con el factor de von Willebrand, una proteína multimérica de gran tamaño implicada en las etapas iniciales de la adherencia de las plaquetas a la pared vascular dañada. La unión al factor de von Willebrand protege al factor VIII frente a la degradación proteolítica. La importancia fisiológica de esta interacción adquiere mayor importancia debido a los niveles reducidos de factor VIII en el plasma de los pacientes que carecen de factor de von Willebrand. El factor VIII es una molécula precursora que, tras su activación, actúa como cofactor del factor IXa en la conversión dependiente de fosfolípidos y de Ca^{2+} del factor X al factor Xa. La activación del factor VIII implica cortes proteolíticos tanto en la cadena pesada como la cadena ligera del factor VIII. Se considera que la trombina es el activador fisiológico del factor VIII y realiza cortes en los residuos Arg³⁷², Arg⁷⁴⁰ y Arg¹⁶⁸⁹ del factor VIII. Así pues, el factor VIII activado por trombina consiste en un heterotrímero de los dominios A1 y A2 separados y de la cadena ligera del factor VIII (A3-C1-C2) cortada. El corte por el residuo de Arg¹⁶⁸⁹ de la cadena ligera del factor VIII tiene como resultado la eliminación de la secuencia de aminoácidos Glu¹⁶⁴⁹-Arg¹⁶⁸⁹, que resulta fundamental para la unión del factor VIII al factor de von Willebrand. Hasta el momento, se han caracterizado tres principales sitios de unión de los inhibidores del factor VIII (Scandella y otros. 1994, Blood 86: 1811-1819; Healey y otros. 1995, J. Biol. Chem. 270: 14505-14509; Fijnvandraat y otros. 1998, Blood 91: 2347-2352).

Los residuos de aminoácidos Val²²⁴⁸-Ser²³¹² del dominio C2 constituyen un sitio de unión para los inhibidores del factor VIII. El gran tamaño de este epítipo sugiere que, en el plasma de los pacientes que presenten inhibidores con especificidad por C2, aparecen varios anticuerpos que se unen a diferentes regiones de aminoácidos de este área. Se ha explorado con considerable detalle el mecanismo de acción de los anticuerpos contra C2. La mayor parte de estos anticuerpos interfieren con la unión del factor VIII a los fosfolípidos. Además, algunos de los anticuerpos con especificidad por C2 también inhiben la interacción del factor VIII con su portador, el factor de von Willebrand. Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo para la inhibición del factor VIII por acción de un aloanticuerpo humano (Saenko y otros. 1996, J. Biol. Chem. 271: 27424-27431). Se ha demostrado que un aloanticuerpo humano que se une exclusivamente a la parte amino terminal (Val²²⁴⁸-Gly²²⁸⁵) del epítipo C2 inhibe la liberación inducida por trombina del factor VIII del factor de von Willebrand.

Los residuos de aminoácidos Arg⁴⁸⁴-Ile⁵⁰⁸ presentes en el dominio A2 del factor VIII constituyen un epítipo importante para los inhibidores del factor VIII. Los estudios sobre los mecanismos de inhibición de los anticuerpos contra A2 han demostrado que los anticuerpos contra A2 interfieren con la conversión del factor X a Xa por acción del complejo factor VIIIa-factor IXa unido a lípidos (Lollar y otros, 1995). Los anticuerpos contra A2 no interfieren con la unión del factor X al complejo factor VIIIa-factor IXa, sino que simplemente limitan la conversión del factor X.

Se ha encontrado un tercer epítipo importante de los inhibidores del factor VIII en el dominio A3 del factor VIII. La unión de los anticuerpos inhibidores dependió de la presencia de los aminoácidos Gln¹⁷⁷⁸-Met¹⁸²³. Estudios previos han demostrado que este sitio representa un sitio de unión para el factor IXa y, de hecho, los anticuerpos que se unen a este sitio interfirieron con la formación del complejo del factor VIIIa con el factor IXa (Fijnvandraat y otros. 1998, Blood 91: 2347-2352). En varios pacientes que presentan un inhibidor, se ha observado la presencia de anticuerpos inhibidores dirigidos contra otros epítopos. Un estudio reciente ha demostrado que los anticuerpos inhibidores pueden reconocer la región de los aminoácidos Met³³⁶-Arg³⁷² del factor VIII (Ware y otros. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 3165-3169). Aún no se ha investigado el mecanismo de inhibición, pero recientemente se ha propuesto la presencia de un sitio de unión del factor X en esta parte de la molécula del factor VIII (Lapan, K.A. y Fay, P.J. 1997, J. Biol. Chem. 272: 2082-2088).

La especificidad epitópica restringida de los inhibidores del factor VIII sugiere que un número limitado de epítopos dominantes de los linfocitos B están implicados en la respuesta inmunitaria al factor VIII. Aparentemente, los anticuerpos humanos contra el factor VIII sintetizados por los clones de linfocitos B de numerosos pacientes, resultan sorprendentemente similares por cuanto respecta a la especificidad epitópica. Esto sugiere que la secuencia primaria de aminoácidos y de nucleótidos de los anticuerpos con especificidad por el factor VIII es similar a nivel molecular. Basándose en esto, resulta deseable definir la presencia y la especificidad epitópica de los anticuerpos contra el factor VIII analizando simplemente la presencia de secuencias de nucleótidos que correspondan con anticuerpos con capacidad de inhibición del factor VIII. Hasta el momento, no se han definido correctamente las secuencias primarias de los anticuerpos contra el factor VIII. Davies y colaboradores han sugerido una asociación entre los inhibidores del factor VIII y la utilización del segmento de gen VH DP73 (Davies y otros. 1997, Thromb. Haemostas, supplement: 2352A). No se ha dado a conocer la secuencia de nucleótidos y la secuencia primaria de aminoácidos de estos anticuerpos, y no se dispone de detalles con respecto a la especificidad epitópica de estos anticuerpos. Existe una clara necesidad de definir con mayor detalle la secuencia primaria de aminoácidos y de nucleótidos de los anticuerpos contra el factor VIII. Dicha información sobre la secuencia puede servir para diseñar pruebas diagnósticas que se puedan utilizar para monitorizar la aparición de clones de linfocitos B que produzcan inhibidores del factor VIII en pacientes con hemofilia

A. Estas pruebas diagnósticas pueden resultar extremadamente sensibles y aportar información sobre la especificidad epitópica de los inhibidores del factor VIII.

5 Los estudios dirigidos a definir la especificidad epitópica y el modo de acción de estos anticuerpos están limitados por la heterogeneidad de estos anticuerpos en el plasma de estos pacientes. Resulta claro que sería necesario contar con unos criterios diagnósticos más restrictivos a fin de definir las propiedades de los inhibidores del factor VIII con mayor detalle.

10 Un incremento repentino de la frecuencia del desarrollo de inhibidores, observado en un grupo de pacientes previamente tratados, se ha asociado con un concentrado del factor VIII pasteurizado particular fabricado en los Países Bajos (Roosendaal y otros. 1993. Blood 81: 2180-2186). Estos inhibidores del factor VIII se dirigen contra la cadena ligera del factor VIII y el mapeo epitópico reveló que la mayor parte de los inhibidores reaccionó con epítomos de los dominios A3-C1 y C2 del factor VIII (Sawamoto y otros. 1998. Thromb. Haemostas. 79: 62-68). Recientemente, un segundo concentrado del factor VIII pasteurizado se ha visto implicado en el desarrollo de inhibidores en un grupo de pacientes que habían sido tratados anteriormente. Asimismo, en este caso los anticuerpos inhibidores presentaron predominantemente especificidad por la cadena ligera del factor VIII (Peerlinck y otros. 1997. Thromb. Haemostas. 77: 80-86). Se ha sugerido que el desarrollo de inhibidores en estos pacientes es debido a pequeñas alteraciones en la molécula del factor VIII, que se han inducido durante el proceso de fabricación. Este hecho puede indicar que los anticuerpos que se desarrollaron en estos pacientes presentan propiedades distintas en comparación con los anticuerpos inhibidores del factor VIII que se desarrollan en otros pacientes. Resulta claro que el conocimiento de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII podría aportar información adicional sobre la etiología de los inhibidores del factor VIII, lo que resulta deseable para la caracterización de la respuesta de los anticuerpos en pacientes que hayan recibido estos concentrados del factor VIII.

25 Hasta el momento, no se han dado a conocer las secuencias primarias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos contra el factor VIII. La presente invención da a conocer las secuencias de nucleótidos que codifican para los anticuerpos humanos con especificidad por el factor VIII. Basándose en la secuencia primaria de estos anticuerpos, se diseñan cebadores oligonucleótidos que permiten detectar linfocitos B que producen anticuerpos con afinidad por el factor VIII. La detección de los linfocitos B específicos del factor VIII se puede conseguir mediante ARNm, ADNc o ADN derivados de los linfocitos de los pacientes. Los ADN, ARN y ADNc genómicos se preparan a partir de linfocitos mediante procedimientos conocidos en la técnica. A continuación se enumeran algunos de los procedimientos para la detección de los clones de los linfocitos B específicos del factor VIII.

35 La amplificación selectiva de las secuencias variables de la cadena pesada (genes VH) se puede utilizar para detectar secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos que forman parte del repertorio de anticuerpos humanos que pueden unirse específicamente al factor VIII. La parte variable de la cadena pesada humana se forma a partir de las regiones de cadena pesada (VH), las regiones de diversidad (D) y las regiones de unión (J). La fusión de estos tres segmentos de genes distintos no es un suceso preciso, y esta denominada "diversidad de unión", junto con el proceso de adición y eliminación de nucleótidos, desemboca en la generación de la región determinante complementaria hipervariable 3 (CDR3). La cadena ligera humana se forma de manera similar, pero carece de la región de diversidad D. Un procedimiento de hipermutación somática, junto con los mecanismos descritos anteriormente, genera una diversidad de secuencias adicional, tanto de las secuencias de cadena pesada como de cadena ligera, lo que tiene como resultado final la generación de anticuerpos de alta afinidad. El conocimiento de las secuencias de nucleótidos que codifican para los anticuerpos específicos contra el factor VIII permite detectar estos anticuerpos específicos en el repertorio de los pacientes que corren el riesgo de desarrollar anticuerpos específicos contra el factor VIII (tales como pacientes con hemofilia A que reciben tratamiento con el factor VIII o pacientes con hemofilia adquirida). La amplificación se puede llevar a cabo mediante una combinación de cebadores oligonucleótidos dirigidos contra las regiones constantes o las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos específicos contra el factor VIII. La detección de los anticuerpos específicos contra el factor VIII se puede realizar utilizando un cebador oligonucleótido derivado de las partes variables de la secuencia de nucleótidos que codifica para los anticuerpos contra el factor VIII y un cebador oligonucleótido derivado de las regiones constantes de los anticuerpos específicos contra el factor VIII. La detección también se puede realizar utilizando dos cebadores oligonucleótidos específicos para las partes variables de la secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo que se une al factor VIII. Los métodos descritos en la presente invención también incluyen la amplificación de genes de inmunoglobulina mediante cebadores oligonucleótidos dirigidos contra las regiones constantes de los genes de inmunoglobulina. La detección subsiguiente de las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII se puede realizar mediante hibridación selectiva con cebadores oligonucleótidos (radiomarcados) dirigidos contra las partes variables de la secuencia de nucleótidos que codifica para los cebadores oligonucleótidos anticuerpos específicos contra el factor VIII. A partir de la descripción anterior, se puede deducir que los cebadores oligonucleótidos se dirigen preferentemente, pero no exclusivamente, hacia las regiones constante y variable de los anticuerpos específicos contra el factor VIII. En el ejemplo 5, se dan a conocer procedimientos que pueden utilizarse para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el factor VIII en una mezcla de secuencias de nucleótidos. La combinación de cebadores oligonucleótidos derivados de la secuencia de nucleótidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII se puede utilizar para evaluar directamente la presencia de los anticuerpos específicos contra el factor VIII en el repertorio de anticuerpos de los pacientes. De manera alternativa, se puede utilizar el análisis mediante procedimientos que incluyen, entre otros, el análisis por secuenciación, la reamplificación de fragmentos obtenidos con cebadores oligonucleótidos más específicos, la digestión con enzimas de restricción y la hibridación selectiva, a fin de evaluar la presencia de anticuerpos contra el factor VIII. La cuantificación de la cantidad de secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos contra el factor VIII se puede

obtener mediante diversos procedimientos conocidos generalmente en la materia, que incluyen, pero no se limitan a los siguientes. Se puede determinar la cantidad de radiactividad incorporada en un fragmento de PCR que codifica para parte de un anticuerpo específico contra el factor VIII. Además, se pueden utilizar sondas oligonucleótidas marcadas radioactivamente para estimar la cantidad de secuencias de nucleótidos que codifican para un anticuerpo específico
 5 contra el factor VIII en una mezcla de fragmentos de ADN que codifica para parte del repertorio de anticuerpos de un paciente. La amplificación mediante PCR cuantitativa puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleótidos modificados con colorantes que permitan monitorizar directamente la cantidad del producto de PCR generado durante la amplificación.

10 Un técnico en la materia puede diseñar otros procedimientos que permitan detectar y cuantificar selectivamente secuencias de nucleótidos específicas que codifiquen para los anticuerpos específicos contra el factor VIII.

En los ejemplos 1-10 se incluyen detalles sobre la identificación y detección de secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos específicos contra el factor VIII en pacientes con hemofilia. Estos ejemplos explican cómo
 15 llegar a las secuencias de nucleótidos de los inhibidores del factor VIII y aportan detalles acerca de la utilización de esta información para la detección de anticuerpos específicos contra el factor VIII.

La presente invención da a conocer las secuencias de nucleótidos y la secuencia primaria de aminoácidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII. Los inhibidores del factor VIII se dirigen, por lo general, contra tres
 20 epítomos principales del factor VIII que se encuentran dentro del dominio A2-A3 y C2 del factor VIII. En el ejemplo 4, se dan a conocer las secuencias primarias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos contra C2. En los ejemplos 8 y 9, se dan a conocer las secuencias primarias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos contra A2 y contra A3-C1. La presente invención explica cómo llegar a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII y los procedimientos dados a conocer en la presente invención se
 25 pueden utilizar para obtener las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos contra el factor VIII con especificidad para otros dominios del factor VIII, que sirvan como diana para los inhibidores del factor VIII. Los anticuerpos contra el factor VIII codificados por las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la presente invención, se pueden utilizar en el desarrollo de agentes terapéuticos que sean capaces de limitar la actividad biológica de los inhibidores del factor VIII. Estos agentes terapéuticos contienen preferentemente, sin constituir limitación:

30 1. Los fragmentos de anticuerpo (o agentes basados en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos) puede utilizarse para la generación de anticuerpos antiidiotípicos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden administrar o bien junto con el factor VIII o bien administrarse solos. Asimismo, se pueden utilizar péptidos o agentes relacionados, que estén basados en la secuencia primaria de aminoácidos de las partes variables de los anticuerpos específicos
 35 contra el factor VIII para inducir la formación de anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra los inhibidores del factor VIII. Los anticuerpos antiidiotípicos también se pueden obtener cribando colecciones de gran tamaño (semisintéticas) que codifiquen para una amplia variedad de anticuerpos recombinantes. La preparación de anticuerpos antiidiotípicos también puede tener lugar en animales, entre los que se incluyen, sin constituir limitación, ratones, mediante inyección del anticuerpo recombinante dado a conocer en la presente invención. Seguidamente, los anticuerpos antiidiotípicos se pueden obtener mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. También se puede obtener una
 40 respuesta antiidiotípica a los anticuerpos específicos contra el factor VIII mediante la inyección de la parte codificante del ADN de las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII, que se puede obtener mediante los procedimientos descritos en la presente invención. Se considera que la inmunización conseguida mediante la inyección del ADN es sólo ligeramente inmunógena, y es necesario utilizar otros agentes para obtener una respuesta
 45 inmunitaria lo suficientemente elevada. La inyección conjunta de ADN plasmídico que codifica para IL-2, GM-CSF y toxoide tetánico se ha utilizado para potenciar la respuesta inmunitaria al ADN inyectado (Spellerberg y otros. 1997. J. Immunol. 15:1885-1892). Es posible utilizar procedimientos similares para potenciar la respuesta inmunitaria hacia los fragmentos de ADN que codifican para los anticuerpos específicos contra el factor VIII.

50 2. Los fragmentos de anticuerpos recombinantes descritos en la presente invención se pueden utilizar como agentes terapéuticos para el tratamiento de pacientes que presentan un inhibidor. Los ejemplos 7 y 10 dan a conocer que los fragmentos de anticuerpos recombinantes (denominados scFv's) que se unen específicamente al dominio C2, interfieren con la unión de los anticuerpos inhibidores contra el factor VIII. Estos scFv's se pueden utilizar para el
 55 tratamiento de pacientes que presenten anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C2. La presente invención da a conocer un procedimiento para conseguir fragmentos de anticuerpos recombinantes que se unan específicamente a los dominios A2, A3-C1 y C2 del factor VIII. Utilizando los procedimientos descritos en la presente invención, se pueden obtener fragmentos de anticuerpo adicionales dirigidos contra estas y otras regiones del factor VIII. Estas regiones incluyen, entre otras, Arg⁴⁸⁴-Ile⁵⁰⁸ en el dominio A2, Gln¹⁷⁷⁸-Met¹⁸²³ en el dominio A3 y Val²²⁴⁸-Ser²³¹² en el dominio C2. Preferentemente, una preparación farmacéutica incluirá anticuerpos recombinantes dirigidos contra
 60 múltiples epítomos, dado que la mayoría de los pacientes presentan anticuerpos inhibidores dirigidos contra múltiples epítomos del factor VIII. La actividad neutralizante de los inhibidores propia de los fragmentos de anticuerpos recombinantes descritos en la presente invención, se puede modificar mediante la introducción de mutaciones puntuales en las partes constante y variable de estos fragmentos. Además, los fragmentos de anticuerpos recombinantes descritos en la presente invención se pueden clonar en vectores que permitan la expresión de estos fragmentos, por ejemplo,
 65 en forma de fragmento Fab. Un técnico en la materia conocerá otros vectores que pueden utilizarse para la expresión de los anticuerpos y de los fragmentos de anticuerpos (véase, por ejemplo: "Antibody Engineering; A Practical Approach" [Ingeniería de anticuerpos: un enfoque práctico] editado por Mc Cafferty y otros. 1996. Oxford University Press). Existen procedimientos para incrementar la afinidad de los anticuerpos recombinantes o de los fragmentos de

anticuerpos, que pueden utilizarse para modular las actividades biológicas de los fragmentos de anticuerpos recombinantes descritos en la presente invención. Se pueden utilizar péptidos o agentes relacionados con péptidos, que se hayan diseñado sobre la base de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos recombinantes descritos en la presente invención (por ejemplo, péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos de CDR3), para interferir con la actividad de los inhibidores del factor VIII.

En resumen, la presente invención da a conocer un procedimiento mejorado para definir anticuerpos inhibidores del factor VIII. Los procedimientos descritos tienen como resultado la definición de una secuencia de nucleótidos de los inhibidores del factor VIII y explican cómo utilizar esta información para desarrollar procedimientos mejorados para la detección de los inhibidores del factor VIII. La presente invención también da a conocer preparaciones farmacéuticas, derivadas de la secuencia de nucleótidos y/o de la secuencia primaria de aminoácidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII, que se pueden utilizar en el tratamiento de pacientes con hemofilia A con anticuerpos inhibidores dirigidos contra el factor VIII. La dosis de los agentes terapéuticos que se administrará un paciente depende, obviamente, de la afinidad del agente terapéutico por el factor VIII. La afinidad de los fragmentos de anticuerpos recombinantes descritos en la presente invención puede variar considerablemente, según se describe en los ejemplos 6 y 7. La dosis que se administrará también depende del peso corporal del paciente, del título del inhibidor del factor VIII y de las actividades biológicas de los distintos componentes del agente terapéutico utilizado. La dosis que se administrará se puede estimar según los procedimientos que se dan a conocer los ejemplos 7 y 10. Estos procedimientos se pueden complementar con estudios de ajuste de la dosis, que consisten en la administración de los agentes terapéuticos en modelos animales y en pacientes sanos. En general, la dosis administrada variará entre 10 μg - 5 g/kg y más preferentemente entre 100 μg - 1g/kg de peso corporal por día.

El agente terapéutico se puede administrar en combinación con el factor VIII (o con un sustituto del factor VIII). La dosis del factor VIII administrada junto con el agente terapéutico puede variar entre 0,1 y 2000 unidades por kg y más preferentemente entre 1 y 200 unidades por kg de peso corporal por día.

Las palabras “forma sustancialmente aislada”, según se emplean en el presente documento, se refieren a una forma del material que se encuentra en una forma distinta a cualquier forma natural de dicho material, es decir, diferente al material en su entorno natural. En particular, las palabras pretenden definir la ausencia relativa de las sustancias acompañan al material en su forma natural.

Ejemplo 1

Caracterización de los anticuerpos contra el factor VIII en plasma de pacientes

Los anticuerpos contra el factor VIII presentes en el plasma de un paciente con hemofilia adquirida se caracterizaron mediante experimentos de inmunoprecipitación y neutralización. La construcción de fragmentos de factor VIII recombinantes correspondientes al dominio A2, A3-C1-C2 y C2 del factor VIII se ha descrito anteriormente (Fijnvandraat y otros. 1997. Blood 89: 4371-4377; Fijnvandraat y otros. 1998. Blood 91: 2347-2352). Estos fragmentos de factor VIII recombinantes se marcaron metabólicamente con [³⁵S]-metionina y se utilizaron posteriormente para la detección de anticuerpos contra el factor VIII mediante inmunoprecipitación utilizando los procedimientos que se han descrito anteriormente (Fijnvandraat y otros. 1998. Blood 91: 2347-2352). Se observó reactividad con todos los dominios A2, A3-C1-C2 y C2 marcados metabólicamente (datos no mostrados). Esto indica que el plasma del paciente contenía al menos dos clases de anticuerpos dirigidos contra el factor VIII. Para determinar la contribución de los distintos anticuerpos presentes en el plasma del paciente al título del inhibidor, medida según el ensayo Bethesda, realizamos experimentos de neutralización. Se mezclaron concentraciones crecientes de fragmentos de factor VIII recombinantes con muestras que contenían anticuerpos contra el factor VIII diluidas hasta una capacidad inhibidora final de 2 UB/ml. La adición tanto de la cadena ligera del factor VIII recombinante (A3-C1-C2) como del dominio C2 tuvo como resultado un descenso de la actividad inhibidora del 50 y el 20%, respectivamente. La adición de la cadena pesada del factor VIII (dominios A1-A2-B) tuvo como resultado una neutralización del 45% de la inhibición en el plasma del paciente. A la vista de estos datos, hemos concluido que los anticuerpos inhibidores dirigidos contra la cadena pesada contribuyen al 45% de la capacidad inhibidora de los anticuerpos contra el factor VIII del paciente, mientras que los anticuerpos contra A3-C1-C2 son responsables de la otra mitad de la capacidad inhibidora. Nuestros resultados aportan pruebas sobre la presencia, como mínimo, de tres clases de anticuerpos inhibidores en el plasma del paciente. Posteriormente, determinamos la subclase de los anticuerpos contra el factor VIII utilizando procedimientos que se han descrito anteriormente (Fijnvandraat y otros. 1997. Blood 89: 4371-4377). Los anticuerpos con especificidad por A2 comprendieron predominantemente la subclase IgG4; además, se observaron pequeñas cantidades de la subclase IgG2. Los anticuerpos dirigidos contra la cadena ligera del factor VIII comprendieron exclusivamente la subclase IgG4. Los procedimientos descritos anteriormente portan un punto de partida para una caracterización adicional de los anticuerpos humanos con especificidad por el factor VIII. Se pueden realizar análisis similares en muestras derivadas de otros pacientes que se analicen para evaluar la presencia de inhibidores del factor VIII.

Ejemplo 2

Construcción de una colección específica de IgG4

Se aislaron linfocitos de sangre periférica de una muestra de sangre de un paciente con hemofilia adquirida. El título del inhibidor fue de 1250 UB/ml. Se aisló ARN de los linfocitos mediante RNazol (WAK Chemie, Alemania),

ES 2 313 783 T3

siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procedió a transcribir el ARN en ADNc utilizando cebadores de hexámeros aleatorios (Gibco, Breda, Países Bajos). Dado que la mayor parte de los anticuerpos contra el factor VIII descritos en el ejemplo 1 fueron de la subclase IgG4, se amplificaron los fragmentos de ADN correspondientes a la cadena pesada de las inmunoglobulinas de la subclase IgG4 utilizando el siguiente conjunto de cebadores oligonucleótidos:

5	conIgG1-4	5' CTTGTCCACCTTGGTGTGCTGGG 3'
	huIgG4	5' ACGTTGCAGGTGTAGGTCTTC 3'
10	huVH1aback	5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG 3'
	huVH2aback	5' CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG 3'
	huVH3aback	5' GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG 3'
15	huVH4aback	5' GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCGGG 3'
	huVH5aback	5' GAGGTACAGCTGCAGCAGTCTGC 3'
20	huVH6aback	5' CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG 3'
	huJH1-2forSal	5' GAGTCATTCTCGT <u>GTCGAC</u> ACGGTGACCAGGGTGCC 3'
	huJH3forSal	5' GAGTCATTCTCGT <u>GTCGAC</u> ACGGTGACCATTGTCCC 3'
25	huJH4-5forSal	5' GAGTCATTCTCGT <u>GTCGAC</u> ACGGTGACCAGGGTTCC 3'
	huJH6forSal	5' GAGTCATTCTCGT <u>GTCGAC</u> ACGGTGACCCTGGTCCC 3'
30	huVH1backNco	5' AATCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCA 3'
	huVH2backNco	5' AATCCATGGCCCAGGTCAACTTAAGGGA 3'
	huVH3backNco	5' AATCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGA 3'
35	huVH4backNco	5' AATCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGCA 3'
	huVH5backNco	5' AATCCATGGCCGAGGTACAGCTGCAGCA 3'
40	huVH6backNco	5' AATCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCA 3'

Los cebadores oligonucleótidos huVHa(1-6)back y huJH(1-6)forSal se han descrito anteriormente (Marks y otros. 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597). Los cebadores oligonucleótidos huVH(1-6)backNco se han adaptado a partir de cebadores oligonucleótidos descritos en la misma publicación. La primera serie de amplificación se llevó a cabo con cebadores huVH(1-6)back junto con el cebador conIgG1-4. Se obtuvieron seis fragmentos de ADN distintos de unas 700 pb, correspondiente cada uno de ellos a una familia de genes VH individuales. Se aislaron seis fragmentos distintos y se reamplificaron con los cebadores huVH(1-6)back y con el cebador huIgG4. Se obtuvieron seis productos de aproximadamente 660 bp. Los seis fragmentos de 660 bp diferentes, que representaron el repertorio IgG4 del paciente, se reamplificaron con los cebadores huVH(1-6)backNco y huJH(1-6)forSal a fin de preparar estos fragmentos para su clonación. Los 24 fragmentos resultantes se mezclaron según la familia de genes VH y los seis fragmentos distintos se digirieron con NcoI y SalI. Estos fragmentos digeridos se purificaron y se disolvieron en TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0; 0,1 mM EDTA). El vector pHEN-1-VLrep se ha descrito previamente (Griffin, H.M. y Ouweland, W.H. 1995. *Blood* 86, 4430-4436; Schier y otros. 1996. *J. Mol. Biol.* 255: 28-43) y contiene un repertorio de cadena ligera derivado de dos donantes no inmunizados. Se ha demostrado que la inserción de un repertorio de cadena pesada en este vector tiene como resultado la producción de fragmentos de anticuerpos que constan de los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Estos fragmentos de anticuerpo se han denominado fragmento Fv (scFv) de cadena sencilla (Hoogenboom, H.R. y otros. 1991. *Nucleic Acid Res.* 19: 4133-4137). El vector pHEN-1-VLrep (cedido amablemente por el Dr. W.H. Ouweland, Departamento de medicina de transfusión, Universidad de Cambridge, Reino Unido) se digirió con XhoI y NcoI y se insertaron los seis fragmentos correspondientes al repertorio de cadena pesada específico de IgG4 del paciente con hemofilia adquirida. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* TG1 y se obtuvo una colección de 1.500.000-2.500.000 de clones independientes. Las colonias se rascaron y se resuspendieron en medio 2TY enriquecido con un 15% de glicerol, 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa. De forma similar a los procedimientos descritos anteriormente, se pueden crear colecciones que representen el repertorio de inmunoglobulina de otros pacientes.

Ejemplo 3

Selección de anticuerpos específicos contra el factor VIII

5 La selección de los clones que codifican para los fragmentos de anticuerpo (scFvs) con especificidad por el factor VIII se realizó según lo que se describe a continuación. Se extendieron disoluciones de partida de glicerol en placas con 2TY que contenían ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y 1% de glucosa. Las colonias se dejaron crecer toda la noche y se rascaron al día siguiente, y se disolvieron en medio 2TY enriquecido con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 1% de glucosa. Estas células se disolvieron en medio 2TY enriquecido con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y 1% de glucosa hasta una densidad óptica final (DO) de 0,3 (determinada a 600 nm). Las células se dejaron crecer a 37°C hasta alcanzar una DO de 0,5. Posteriormente, se diluyó 1 ml de cultivo 10 veces en medio 2TY con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y 1% de glucosa. A continuación, se añadieron 20 μl de fago coadyuvante (VCSM13; 1×10^{11} ufp/ml) y la mezcla se incubó durante 45 minutos a 37°C sin agitación. A continuación, las células se incubaron a 37°C con agitación a 150 rpm durante otros 45 minutos. Las células se precipitaron mediante centrifugación a baja velocidad y se resuspendieron en 100 ml de medio 2TY enriquecido con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), 0,1% de glucosa y 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Las células se incubaron toda la noche a 30 °C. Al día siguiente, las células se precipitaron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se dejó que el fago recombinante precipitase durante 2 horas a 4°C tras la adición de 1/5 volumen de PEG6000 al 20%/NaCl 2,5 M. Los fagos se precipitaron mediante centrifugación (30 minutos a 10000 rpm) y se resuspendieron en 5 ml de TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM). Esta preparación se precipitó mediante centrifugación durante 5 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se conservó a 4°C.

La selección de los fagos con capacidad de unión al factor VIII se realizó según lo descrito a continuación. Se recubrieron micropocillos durante toda la noche a 4°C con 5 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo monoclonal murino CLB-CAG 12 específico contra la cadena ligera del factor VIII, que se diluyó en NaHCO_3 50 mM (pH 9,5). Los pocillos se bloquearon durante 1 hora a 37°C con TBS enriquecida con un 3% de HSA. La solución del fago (1×10^{12} ufp/ml) se diluyó 1 a 1 en TBS enriquecida con un 6% de HSA y un 1% de Tween-20 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con micropocillos que contenían CLB-CAG 12 inmovilizado. La solución del fago se retiró y se transfirió a un segundo micropocillo (también recubierto con CLB-CAG 12) que se había preincubado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de la cadena ligera del factor VIII. Los fagos se incubaron con la cadena ligera del factor VIII durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 20 veces con TBS/0,1% de Tween-20 y 20 veces con TBS y el fago unido se eluyó con trietilamina 100 mM (pH 12). El fago eluido (volumen de 1 ml) se neutralizó mediante la adición de 500 μl de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y, posteriormente, se añadieron a 5 ml de *E. coli* TGI (DO 600 = 0,5). Las células se incubaron durante 1/2 hora a 37°C (sin agitación) y 10 minutos a 37°C (con agitación a 200 rpm). Las células se recogieron mediante centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm durante 7 minutos. Posteriormente, las células TG1 infectadas se extendieron en placas con agar 2TY enriquecidas con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y 1,0% de glucosa. Las células se dejaron crecer toda la noche a 30°C. Las células se rascaron en medio 2TY enriquecido con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), 1% de glucosa y 15% de glicerol. Las ampollas se conservaron a -70°C.

De forma alternativa, la cadena ligera del factor VIII (5 $\mu\text{g/ml}$ en NaHCO_3 50 mM (pH 9.6)) se inmovilizó en inmunotubos (Nunc, Life Technologies, Breda, Países Bajos). En primer lugar, 1 ml de solución de fago diluida en TBS enriquecida con un 3% de HSA se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en inmunotubos no recubiertos. A continuación, se retiró 1 ml de solución de fago y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en inmunotubos recubiertos con la cadena ligera del factor VIII. Los inmunotubos se lavaron 20 veces con TBS/0,1% de Tween-20 y 20 veces con TBS. El fago unido eluyó con trietilamina 100 mM (pH 12) y se procesó según lo descrito anteriormente.

Se inició la segunda ronda de cribado inoculando 50 μl de solución de partida de glicerol obtenida tras la primera selección en 10 ml de medio 2TY enriquecido con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y 1% de glucosa hasta una DO600 final de 0,3. Las células se dejaron crecer hasta una DO600 de 0,5, se diluyeron 1 a 10 en medio 2TY enriquecido con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$) y 1% de glucosa y posteriormente se infectaron con un exceso de 20 veces de VCSM13. Las células se dejaron crecer toda la noche a 30°C. El sobrenadante, que contenía el fago, se recogió según lo descrito anteriormente y de nuevo se evaluó su unión a la cadena ligera del factor VIII inmovilizada. Tras cuatro rondas de cribado, se cultivaron 30 clones seleccionados mediante ELISA y 30 clones que se obtuvieron tras un cribado con la cadena ligera del factor VIII inmovilizada en inmunotubos, y se analizó su unión a la cadena ligera del factor VIII. Las colonias se recogieron y se dejaron crecer toda la noche en 2 ml de medio 2TY enriquecido con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 1% de glucosa. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron 200 veces y se dejaron crecer hasta una DO600 de aproximadamente 0,5. A continuación, las células se infectaron con VCSM13 durante 45 minutos a 37°C (sin agitación) y 45 minutos a 37°C (con agitación a 200 rpm). Los cultivos infectados se diluyeron 1 a 10 en medio 2TY enriquecido con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, 0,1% de glucosa y 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, y las células se dejaron crecer toda la noche a la 30°C. El sobrenadante, que contenía el fago, se recogió tras su centrifugación y se analizó su unión a la cadena ligera del factor VIII, según lo descrito a continuación. El anticuerpo monoclonal murino CLB-CAG 12 no inhibitorio, dirigido contra el epítipo del dominio A3-C1 del factor VIII, se inmovilizó en pocillos a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en NaHCO_3 50 mM (pH 9,5). Los pocillos se bloquearon durante 1 hora en TBS enriquecida con 3% de HSA. Los pocillos se incubaron con la cadena ligera del factor VIII a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en Tris HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 1 M, y 2% de HSA durante 2 horas a 37°C. Se añadieron cincuenta μl de solución de fago y un volumen igual de TBS enriquecida con 1% de Tween-20 y 6% de HSA a los pocillos que contenían la cadena ligera del factor VIII. Para monitorizar la unión específica de los fagos, los pocillos que no contenían la cadena ligera del factor VIII se incubaron simultáneamente con la misma solución de fago. Los fagos se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se agitaron a intervalos regulares. Posteriormente, los pocillos se lavaron intensamente

5 veces con TBS enriquecida con 0,1% de Tween-20 y 5 veces con TBS. La presencia de fago unido se monitorizó mediante incubación con un anticuerpo policlonal dirigido contra M13 marcado con peroxidasa (Pharmacia-LKB, Woerden, Países Bajos) en una dilución de 1 a 4000 en TBS enriquecida con 1% de HSA y 0,1% de Tween-20. Las placas se lavaron 5 veces con TBS enriquecida con 0,1% Tween-20 y 5 veces con TBS. La unión del anticuerpo contra M13 marcado con peroxidasa se cuantificó mediante incubación con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La conversión del sustrato se detuvo mediante la adición de 100 μ l de H₂SO₄ 2N. Parte de los resultados de este análisis se incluyen en la figura 1. Se aporta un ejemplo de 12 clones que presentan unión específica a la cadena ligera del factor VIII. Resulta claro que el fago codificado por los clones 1 a 12 presenta unión a la cadena ligera del factor VIII (barras negras). Se puede observar cierta unión de fondo, que no depende de la presencia de la cadena ligera del factor VIII (barras grises). Las barras marcadas con c representan dos clones que expresan fragmentos de anticuerpo que no se unen específicamente a la cadena ligera del factor VIII. Estos clones se han derivado de la colección inicial y no se han seleccionado sobre la cadena ligera del factor VIII. Para garantizar el incremento de la cantidad de fragmentos de anticuerpos recombinantes específicos contra el factor VIII durante las rondas subsiguientes de cribado, analizamos 12 clones obtenidos tras la primera ronda de cribado en cuanto a su unión a la cadena ligera del factor VIII (figura 2). Sólo 3 de los 12 clones se unen específicamente a la cadena ligera del factor VIII. En 9 de 12 clones, la unión del fago no depende de la presencia de la cadena ligera del factor VIII. Estos resultados indican con claridad que, durante el cribado, se puede incrementar selectivamente la cantidad de fagos que expresan anticuerpos específicos contra el factor VIII. En resumen, hemos descrito un protocolo específico para la selección de anticuerpos específicos contra el factor VIII que se corresponden con el espectro de los anticuerpos contra el factor VIII presentes en el paciente con hemofilia adquirida. En los primeros dos ejemplos, nuestro análisis está limitado al material derivado de un único paciente, y sólo se han analizado los anticuerpos dirigidos contra la cadena ligera del factor VIII. Mediante los procedimientos descritos en estos dos ejemplos, se puede obtener fácilmente el repertorio de anticuerpos contra el factor VIII de otros pacientes que presentan un inhibidor. Además, se pueden obtener los anticuerpos contra el factor VIII dirigidos contra epítomos localizados fuera de la cadena ligera del factor VIII adaptando los procedimientos de selección utilizados en el ejemplo 1 y 2. Se pueden seleccionar los anticuerpos dirigidos contra la cadena pesada inmovilizando la cadena pesada del factor VIII utilizando el anticuerpo monoclonal CLB-CAg 9. En estos dos ejemplos, nos hemos centrado en el repertorio IgG4 del paciente. De forma similar, se pueden investigar otras subclases utilizando los cebadores apropiados. Por ejemplo, la subclase IgG1-4 se puede detectar simplemente utilizando el cebador conIgG1-4 descrito en el ejemplo 1. De igual forma, se pueden utilizar otros cebadores específicos de IgA, IgM, IgE e IgD para crear repertorios de anticuerpos que incluyan anticuerpos específicos contra el factor VIII.

Ejemplo 4

Características de la secuencia de los anticuerpos recombinantes con especificidad por la cadena ligera del factor VIII

En los ejemplos anteriores, se han descrito procedimientos para obtener anticuerpos recombinantes con especificidad por el factor VIII. Para obtener información sobre las propiedades de estos anticuerpos, seleccionamos 30 clones que habían sido seleccionados mediante factor VIII inmovilizado en inmunotubos. Asimismo, se analizaron 30 clones que habían sido seleccionados utilizando la cadena ligera del factor VIII con el anticuerpo monoclonal CLB-CAg 12. Los clones se cultivaron según lo descrito en el ejemplo 2 y se aisló el ADN plasmídico. La secuencia de nucleótidos de la parte variable de la cadena pesada (dominio VH) de 55 clones se determinó utilizando el cebador inverso M13 marcado con fluorescencia en un secuenciador de ADN ABI-Prism 377. Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias de la cadena pesada incluidas en la base de datos "V BASE" del MRC Centre of Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Los 55 clones analizados estaban codificados por dos segmentos de genes VH distintos DP-10 y DP-14 (Cook y Tomlinson, Immunology Today 16: 237-242). Los 41 clones codificados por la secuencia de estirpe bacteriana DP 14 consistieron en tres grupos de anticuerpos recombinantes que difirieron principalmente en las secuencias de nucleótidos de las regiones constantes del gen VH. Treinta y tres clones fueron representados por el clon IT2, 5 clones fueron representados por EL25 y 3 clones fueron representados por el clon EL5 (Tabla I). Se seleccionaron dos clones codificados por DP10 (EL 14) y DP14 (IT2) para su análisis posterior. En las figuras 3 y 4 se incluyen las secuencias de nucleótidos y las secuencias primarias de aminoácidos de estos clones. En la tabla I se incluyen las características de las dos secuencias. Es muy probable que parte del clon EL 14 se derive del segmento D D6-13 y del segmento J JH-3b. Se ha producido una hipermutación somática durante la respuesta inmunitaria, hecho puesto en evidencia por el gran número de cambios de nucleótidos observados, en comparación con las secuencias de estirpe bacteriana de los segmentos VH. La parte de la cadena pesada variable del clon IT2 contiene 20 sustituciones de nucleótidos, en comparación con el segmento de estirpe bacteriana DP-14. Estas 20 sustituciones de nucleótidos tienen como resultado unos cambios totales de 13 aminoácidos (tabla I). La parte de la cadena pesada variable del clon EL 14 contiene 18 sustituciones de nucleótidos, en comparación con el segmento de estirpe bacteriana DP-10. Estas 18 sustituciones de nucleótidos tienen como resultado 12 cambios de aminoácidos (tabla I). El clon IT2 se ha obtenido en parte a partir de los segmentos de genes D3-3 y JH6b. Es importante destacar que se observa una elongación de residuos G entre las secuencias de estirpe bacteriana DP 14 y D3-3 para el clon IT2 que codifica para una rama flexible de residuos de glicina. La inspección de la secuencia de aminoácidos del clon EL14 y IT2 revela varias características interesantes. Ambas regiones CDR3 contienen varios residuos de glicina en sus partes amino terminales, que vienen seguidos, en ambos casos, de tirosina y ácido glutámico (GG-YE). Además, parece conservarse una prolina, una alanina y un ácido aspártico en la parte carboxilo terminal de CRD3 (P---A-D). Se pueden derivar un patrón común de las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR3 del clon EL14 y IT2, que se indica en la figura 4B. Estas características pueden determinar la especificidad de estos anticuerpos por la cadena ligera del factor VIII. En este ejemplo, se han dado a conocer las secuencias de nucleótidos y las secuencias primarias de aminoácidos de dos anticuerpos

recombinantes contra el factor VIII. Mediante procedimientos similares a los descritos en este ejemplo, se pueden analizar anticuerpos recombinantes dirigidos contra otras regiones de la molécula del factor VIII. Las características comunes de estos anticuerpos se pueden identificar según lo descrito en este ejemplo, y se pueden utilizar agentes terapéuticos y diagnósticos derivados de estas características comunes para el diagnóstico y tratamiento de pacientes que presenten inhibidores del factor VIII.

Ejemplo 5

Detección de secuencias de nucleótidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII presentes en muestras de pacientes.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos descritos en el ejemplo anterior se pueden utilizar para detectar específicamente los anticuerpos contra el factor VIII con especificidad por C2 en mezclas heterogéneas de anticuerpos. Esto se puede lograr desarrollando reactivos, por ejemplo, anticuerpos que reconocen específicamente los anticuerpos contra el factor VIII descritos en la presente invención. La detección de los anticuerpos específicos contra el factor VIII también se puede realizar mediante un análisis de la presencia de secuencias de nucleótidos específicas que codifican para anticuerpos específicos contra el factor VIII. En la presente invención se dan a conocer procedimientos para la obtención de secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos específicos contra el factor VIII. En este ejemplo, se da a conocer la detección de secuencias de nucleótidos que codifican para uno de los anticuerpos específicos contra el factor VIII descritos en el ejemplo anterior (EL 14). Se obtuvieron linfocitos del paciente con hemofilia adquirida descrito en el primer ejemplo. Se aisló el ARN y se preparó el ADNc. Posteriormente, los fragmentos de ADN se amplificaron con los cebadores oligonucleótidos huVH(1-6)aback y conIgG1-4 (véase el ejemplo 2). Los seis fragmentos de 700 pb distintos obtenidos se aislaron y se utilizaron en una segunda PCR con los cebadores oligonucleótidos huVH(1-6)back y huIgG4. Esta operación dio como resultado un fragmento de 660 bp que se clonó en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se evaluó la presencia de secuencias de nucleótidos correspondientes a la del clon EL 14 mediante secuenciación de nucleótidos. Uno de los sesenta clones analizados comprendió secuencias de nucleótidos idénticas a las obtenidas en el clon EL 14. Este análisis muestra que, utilizando como punto de partida las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la presente invención, es posible monitorizar la presencia de anticuerpos específicos contra el factor VIII en muestras de pacientes. En este ejemplo, se utilizan cebadores oligonucleótidos que también se han utilizado para la construcción de la colección específica de IgG4. Se pueden diseñar otras combinaciones de cebadores oligonucleótidos que se basen en las secuencias de nucleótidos del clon EL 14 e IT2, que pueden incluir, entre otros, cebadores oligonucleótidos que se basen en la región CDR3 de estos anticuerpos. En este ejemplo, la detección de anticuerpos específicos contra el factor VIII se realizó mediante análisis de secuencia de nucleótidos. De forma alternativa, la detección de secuencias específicas del factor VIII también se puede realizar mediante hibridación selectiva utilizando sondas que se basen en la secuencia de nucleótidos de los anticuerpos específicos contra el factor VIII dados a conocer en la presente invención.

Los procedimientos dados a conocer en la presente invención permiten aislar anticuerpos contra el factor VIII y determinar sus secuencias de nucleótidos y de aminoácidos. En este ejemplo, hemos descrito procedimientos que detectan los anticuerpos específicos contra el factor VIII que aparecen en el repertorio de un paciente que presente un inhibidor del factor VIII. En los ejemplos 8 y 9, se incluye la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de anticuerpo que se unen al dominio A2- y A3-C del factor VIII. Se pueden utilizar procedimientos similares a los descritos en este ejemplo para detectar secuencias de nucleótidos que codifiquen para los inhibidores del factor VIII con especificidad por A2, A3, C1 o por otro epítopo distinto.

Ejemplo 6

Propiedades de los anticuerpos específicos contra el factor VIII scFv-IT2 y scFv-EL14

Las propiedades bioquímicas de los anticuerpos específicos contra el factor VIII IT2 y EL14 se caracterizaron del siguiente modo. En primer lugar, los plásmidos pHEN-1-VL-EL14 y pHEN-1-VL-IT2 se digirieron con NcoI y NotI y los fragmentos de anticuerpos recombinantes se aislaron y se clonaron en el vector pUC119-sfi/Not-His6 (cedido amablemente por el Dr. W.H. Ouwehand, Departamento de medicina de transfusión, Universidad de Cambridge, Reino Unido). Se identificaron los clones positivos y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una DO600 de 0,8-1,0 en medio 2TY enriquecido con 1% de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. Seguidamente, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM y se dejaron crecer las células durante 3 horas para 30°C. Las células se recogieron mediante centrifugación durante 15 minutos a 4000 g a 4°C. El precipitado se disolvió en 10 ml de Tris-HCl 30 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM y sacarosa al 20% para liberar el contenido del periplasma. La mezcla se incubó a 4°C durante 20 minutos y, posteriormente, las células se recogieron mediante centrifugación (15 min., 10800 g a 4°C). Se recogió el sobrenadante, que consistió principalmente en las proteínas presentes en el periplasma. El precipitado se resuspendió en 10 ml de MgSO₄ 5 mM y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Los desechos celulares residuales se recogieron mediante centrifugación durante 15 minutos a 10800 g. El sobrenadante (designado fracción de choque osmótico) se recogió y se añadió a la fracción que contenía las proteínas derivadas del periplasma. Las fracciones mezcladas se centrifugaron durante 20 minutos a 30000 g a 4°C y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se filtró sobre un filtro de 0,22 µm. Se añadió una mezcla de inhibidores de la proteasa (Complete™ Mini, Boehringer Mannheim, Alemania) y las fracciones mezcladas se dializaron toda la noche frente a un tampón que contenía NaPi 50 mM (pH 7,4), imidazol 20 mM y NaCl 500 mM. Los ScFv's se purificaron mediante una resina de afinidad de níquel Ni-NTA (QIAGEN, Alemania) según se describe a continuación: se equilibró 1 ml de matriz Ni-NTA con NaPi

50 mM (pH 7,4), imidazol 250 mM, NaCl 500 mM y, posteriormente, con NaPi 50 mM (pH 7,4), imidazol 20 mM y NaCl 500 mM. A continuación, el sobrenadante dializado que contenía los scFv's específicos contra el factor VIII se incubó de forma discontinua con la matriz Ni-NTA durante 3 horas a 4°C. A continuación, el Ni-NTA se transfirió a una columna y se lavó con 7 ml de NaPi 50 mM (pH 7,4), imidazol 20 mM, NaCl 500 mM y 7 ml de NaPi 50 mM (pH 7,4), imidazol 35 mM y NaCl 500 mM. Los ScFv's se eluyeron con NaPi 50 mM (pH 7,4), imidazol 250 mM, NaCl 500 mM y se conservaron a 4°C. La pureza de las distintas preparaciones de scFv se evaluó mediante SDS-PAGE, seguido de una tinción con Azul brillante de Coomassie. Todos los ScFv's purificados resultaron ser homogéneos, como mínimo, en un 90%, y migraron con un peso molecular aparente de 30 kDa. En las preparaciones obtenidas, se observó una pequeña cantidad de proteínas con un menor peso molecular. Se investigó la identidad de esta banda mediante inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal 9E 10. El epítipo de este anticuerpo está presente en el extremo carboxilo terminal de los scFv's. Tanto la proteína que migra con un peso molecular de 30 kDa como la de 15 kDa reaccionaron con el anticuerpo monoclonal 9E10 en una inmunotransferencia de tipo Western. Esto indica que, con alta probabilidad, el fragmento 15 kDa corresponde a la cadena ligera de los scFv's. Los scFv's correspondientes al clon IT2 y EL 14 se purificaron según lo descrito anteriormente. Un scFv derivado del clon 04, un clon presente en la colección del paciente que no se unió a la cadena ligera del factor VIII, se incluyó como control negativo. Se evaluó la unión tanto de scFv-IT2 como de scFv-EL14 a la cadena ligera del factor VIII mediante el siguiente ensayo ELISA. El anticuerpo monoclonal 9E10 (5 µg/ml), disuelto en NaHCO₃ 50 mM pH 9,5, se inmovilizó sobre pocillos toda la noche a 4°C. Posteriormente, se añadieron los scFv's purificados diluidos en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 1% de HSA y 0,2% de Tween-20 y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las microplacas se lavaron 5 veces con TBS, 0,1% de Tween-20. A continuación, se añadió la cadena ligera del factor VIII purificada (5 µg/ml) junto con el anticuerpo monoclonal CLB-CAg A marcado con peroxidasa (0,5 µg/ml). La mezcla (diluida en TBS, 0,1% de Tween-20) se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Los micropocillos se lavaron 5 veces con solución salina en tampón Tris (TBS) enriquecida con 0,1% de Tween-20 y 5 veces con TBS. La cantidad de anticuerpo monoclonal CLB-CAg A marcado con peroxidasa que se había unido se cuantificó mediante el sustrato TMB. Los resultados de este análisis se incluyen en la figura 5. Tanto scFv-EL14 como scFv-IT2 reaccionan específicamente con la cadena ligera del factor VIII, mientras que scFv-04 no reaccionó con la cadena ligera del factor VIII. Seguidamente, utilizamos el anticuerpo monoclonal murino inhibidor del factor VIII CLB-CAg 117 para la detección de la cadena ligera del factor VIII unida. Se realizó un ensayo ELISA según lo descrito anteriormente. En lugar de CLB-CAg A marcado con peroxidasa, utilizamos CLB-CAg 117 marcado con peroxidasa para la detección de la cadena ligera del factor VIII inmovilizada. No observamos unión de CLB-CAg 117 cuando la cadena ligera del factor VIII se encuentra inmovilizada por scFv-EL14 y scFv-IT2 (figura 5). Estos resultados muestran que el epítipo de scFv-EL14 y scFv-IT2 se solapa con el de CLB-CAg 117. Anteriormente, habíamos demostrado que el anticuerpo inhibidor CLB-CAg 117 se dirige contra el dominio C2 del factor VIII (Fijnvandraat y otros. 1998. Blood 91: 2347-2352). Aparentemente, ambos scFv's se unen a un epítipo en el dominio C2 del factor VIII que se solapa con el del anticuerpo monoclonal murino inhibitorio CLB-CAg 117.

A continuación, se evaluó la unión de diferentes diluciones de scFv-EL14 y scFv-IT2 a la cadena ligera del factor VIII inmovilizada, según lo descrito anteriormente, utilizando el anticuerpo CLB-CAg A como anticuerpo de detección (figura 6). A partir de este análisis, se observó que ScFv-EL14 se une con mayor afinidad a la cadena ligera del factor VIII, en comparación con scFv-IT2. Estos resultados se complementaron mediante experimentos de inmunoprecipitación para scFv-EL14. Los experimentos de inmunoprecipitación utilizando un fragmento marcado metabólicamente correspondiente al dominio C2 se realizaron esencialmente según lo descrito en publicaciones anteriores (Fijnvandraat y otros. 1998. Blood 91: 2347-2352). El anticuerpo monoclonal 9E10 se enlazó de forma covalente a sefarsa 4B activada con CNBr, y esta matriz se utilizó para unir el scFv-EL14. Se detectó la unión específica del scFv-EL14 al dominio C2 marcado metabólicamente y esto confirma la especificidad por C2 de este fragmento de anticuerpo recombinante. En este ejemplo, se han dado a conocer procedimientos para caracterizar anticuerpo recombinantes con especificidad por el dominio C2. En los ejemplos 8 y 9, describimos la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los fragmentos de anticuerpos recombinantes que se unen específicamente al dominio A2- y A3-C1 del factor VIII. Un técnico en la materia podrá adaptar fácilmente los procedimientos descritos en este ejemplo de forma que permitan caracterizar los anticuerpos recombinantes dirigidos contra A2, A3-C1 u otro epítipo del factor VIII.

Ejemplo 7

Los fragmentos de anticuerpos recombinantes específicos contra el factor VIII scFv-IT2 y scFv-EL 14 neutralizan la actividad de los inhibidores del factor VIII

En el ejemplo anterior, hemos mostrado que scFv-EL14 y scFv-IT2 se unen a la cadena ligera del factor VIII para competir por la unión con el anticuerpo monoclonal murino inhibitorio CLB-CAg 117. Estas observaciones sugieren que el epítipo tanto de scFv-EL14 como de scFv-IT2 se solapa con el de CLB-CAg 117. Se espera que, al igual que CLB-CAg 117, scFv-EL14 y scFv-IT2 inhiban la actividad biológica del factor VIII. Se evaluó la capacidad de inhibición de cantidades crecientes de scFv's purificados mediante el ensayo Bethesda. Sorprendentemente, la adición de hasta 170 µg/ml de scFv no tuvo como resultado la inhibición del factor VIII, según las mediciones realizadas en el ensayo Bethesda. Por el contrario, CLB-CAg 117 inhibió rápidamente el factor VIII, según las determinaciones realizadas con el mismo ensayo. Aparentemente, la unión de scFv-EL 14 y scFv-IT2 al factor VIII no interfiere con la actividad biológica del factor VIII. Este descubrimiento nos llevó a investigar la capacidad tanto de scFv-EL14 como de scFv-IT2 para impedir la inhibición causada por CLB-CAg 117. El anticuerpo monoclonal CLB-CAg 117 se diluyó hasta alcanzar una actividad inhibitoria final de 2 UB/ml. Este valor corresponde a una actividad residual del factor VIII del 25% en el ensayo Bethesda. A continuación, se añadieron concentraciones crecientes de scFv-EL14 y

de scFv-IT2. De forma sorprendente, tanto scFv-EL 14 como scFv-IT2 lograron impedir la actividad inhibitoria del factor VIII propia de CLB-CAg 117 (figura 7). ScFv-EL14 (panel A) resultó ser más eficaz que scFv-IT2 (panel B) al ahora de neutralizar la actividad inhibitoria de CLB-CAg 117. Tanto scFv-EL14 como scFv-IT2 no fueron capaces de neutralizar la actividad inhibitoria del anticuerpo monoclonal CLB-CAg A, dirigido contra los residuos de aminoácidos Glu¹⁸¹¹-Lys¹⁸¹⁸ de la cadena ligera del factor VIII (Lenting y otros. 1996. J. Biol. Chem. 271: 1935-1940). Estos resultados muestran, por primera vez, que los fragmentos de anticuerpo con especificidad por el factor VIII se pueden utilizar para interferir con la actividad de los inhibidores del factor VIII. La administración de estos fragmentos de anticuerpo resultará beneficiosa en el tratamiento de pacientes que presenten anticuerpos inhibidores dirigidos contra el factor VIII. En este ejemplo, se da a conocer la actividad biológica de los fragmentos de anticuerpo con especificidad por C2. En los ejemplos 8 y 9, se da a conocer la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los fragmentos de anticuerpos recombinantes que se unen al dominio A2- y A3-C1 del factor VIII. Un técnico en la materia podrá adaptar fácilmente los procedimientos descritos en este y en el ejemplo anterior, de forma que permitan determinar la capacidad de fragmentos de anticuerpos recombinantes dirigidos contra el dominio A2, A3-C1 para neutralizar a los inhibidores del factor VIII. De forma similar a lo descrito en este ejemplo, es posible evaluar la capacidad de neutralización de los inhibidores del factor VIII mostrada por los fragmentos de anticuerpos recombinantes que se unen a otras regiones. De forma similar a lo descrito en este ejemplo para scFv-EL14 y scFv-IT2, los fragmentos de anticuerpo que se unen a A2, A3-C1 y a otros dominios del factor VIII se pueden utilizar en el tratamiento de pacientes que presenten inhibidores del factor VIII.

20 Ejemplo 8

(No forma parte de la presente invención, según las reivindicaciones)

25 *Aislamiento y características de los anticuerpos contra el factor VIII que se unen específicamente al dominio A3-C1 del factor VIII*

Estudios previos han indicado que el plasma de un número importante de pacientes que presentan inhibidores contiene anticuerpos contra el factor VIII que se unen específicamente a los dominios A3-C1 del factor VIII (Fijnvandraat y otros. 1998. Blood 91: 2347-2352; Zhong y otros. 1998. Blood 92: 136-142). En el presente documento, hemos utilizado la tecnología de visualización de fagos para aislar los anticuerpos contra el factor VIII del repertorio total de inmunoglobulina de un paciente con hemofilia A que presente un inhibidor. Previamente, habíamos mostrado que en el plasma de este paciente existen anticuerpos contra el factor VIII dirigidos contra la cadena ligera del factor VIII. La mayor parte de los anticuerpos contra el factor VIII de este paciente están dirigidos contra el dominio A3-C1, mientras que una pequeña parte de los anticuerpos contra el factor VIII reaccionan con el dominio C2 (Fijnvandraat y otros. 1998. Blood 91: 2347-2352). La mayor parte de los anticuerpos contra el factor VIII fueron de la subclase Ig4. Se construyó una colección específica de IgG4 utilizando linfocitos de sangre periférica del paciente como material de partida. Se obtuvo una colección formada por $1,9 \times 10^6$ clones independientes siguiendo los procedimientos descritos en el ejemplo 2. La selección del fago recombinante que se une específicamente al factor VIII se realizó básicamente según lo descrito en el ejemplo 3.

Se recubrieron micropocillos durante toda la noche a 4°C con 5 µg/ml del anticuerpo monoclonal murino CLB-CAg 117 específico contra la cadena ligera del factor VIII, que se diluyó en NaHCO₃ 50 mM (pH 9,5). El anticuerpo monoclonal CLB-CAg 117 se dirige contra el dominio C2 del factor VIII. La utilización de CLB-CAg 117 en el protocolo de selección puede tener como resultado la eliminación de los fagos recombinantes que expresan los fragmentos de inmunoglobulina dirigidos contra el dominio C2 del factor VIII. Se prepararon fagos recombinantes que expresan el repertorio de inmunoglobulina específico de IgG4 según lo descrito en el ejemplo 3. Los fagos recombinantes se incubaron inicialmente en micropocillos que contenían CLB-CAg 117 inmovilizado durante 2 horas en TBS enriquecido con 3% de HSA y 0,5% de Tween-20. La solución del fago se retiró y se transfirió a un segundo micropocillo (también recubierto con CLB-CAg 117) que se había preincubado con 1 µg/ml de la cadena ligera del factor VIII. Se dejó que los fagos se unieran a la cadena ligera del factor VIII inmovilizada durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron intensamente, según lo descrito en el ejemplo 3, y el fago unido se eluyó con trietilamina 100 mM (pH 12). El fago eluido se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y la solución resultante se utilizó para infectar células *E. coli* TG1, según lo descrito en el ejemplo 3.

De forma alternativa, el factor VIII purificado (5 µg/ml en NaHCO₃ 50 mM (pH 9,6)) se inmovilizó en inmunotubos (Nunc, Life Technologies, Breda, Países Bajos). En primer lugar, los fagos recombinantes diluidos en TBS enriquecido con un 3% de HSA se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en inmunotubos no recubiertos. A continuación, se retiró 1 ml de solución de fago y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en inmunotubos recubiertos con el factor VIII. Tras un lavado intenso (20 veces con TBS/0,1% de Tween-20 y 20 veces con TBS), el fago unido se eluyó con trietilamina 100 mM (pH 12) y se procesó según lo descrito anteriormente.

La segunda, tercera y cuarta rondas de cribado se realizaron siguiendo el protocolo de selección descrito anteriormente. Tras la cuarta ronda de cribado, se recogieron 15 clones individuales y se analizó la unión del fago recombinante a la cadena ligera del factor VIII y al dominio A3-C1. La cadena ligera del factor VIII se purificó según lo descrito anteriormente. Se preparó una construcción que expresó el dominio A3-C1 recombinante, siguiendo básicamente el procedimiento descrito en publicaciones anteriores (Sawamoto y otros. 1998. Thrombosis and Haemostasis (Thrombosis y hemostasia) vol. 78, 62-68) y se expresó en células CHO. El anticuerpo monoclonal murino CLB-CAg 12 no inhibitorio, dirigido contra el epítipo del dominio A3-C 1 del factor VIII, se inmovilizó en pocillos a una concentra-

ES 2 313 783 T3

ción de 5 $\mu\text{g/ml}$ en NaHCO_3 50 mM (pH 9,5). Los pocillos se bloquearon durante 1 hora en TBS enriquecido con 3% de HSA. Posteriormente, los pocillos se incubaron con la cadena ligera del factor VIII (1 $\mu\text{g/ml}$) o con el dominio A3-C1 recombinante (0,06 nM) en Tris HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 1 M, y 2% de HSA durante 2 horas a 37°C. Se añadieron cincuenta μl de solución de fago y un volumen igual de TBS enriquecido con 1% de Tween-20 y 6% de HSA a los pocillos que contenían la cadena ligera del factor VIII o el dominio A3-C1 inmovilizados. Para monitorizar la unión específica del fago, los pocillos que no contenían la cadena ligera del factor VIII o el dominio A3-C1 se incubaron simultáneamente con la solución de fago. El fago se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y se agitó a intervalos regulares. Los pocillos se lavaron intensamente con TBS enriquecido con 0,1% de Tween-20. La presencia del fago unido se monitorizó según lo descrito en el ejemplo 3. Los resultados del análisis se muestran en la figura 8. En el panel A, se representan 15 clones seleccionados en inmunotubos que contenían el factor VIII. De los 15 clones analizados, 1 clon (clon 20) no reaccionó con la cadena ligera del factor VIII ni con el dominio A3-C1 recombinante, lo que sugiere que este clon no codifica para un fragmento de anticuerpo con especificidad por el dominio A3-C1 del factor VIII. Tres clones (clones 17, 23 y 24) reaccionaron con la cadena ligera del factor VIII, pero no reaccionaron con el dominio A3-C1 recombinante. Aparentemente, epítipo de estos fragmentos de anticuerpos recombinantes se localiza en el dominio C2 del factor VIII. Los 11 clones restantes reaccionan tanto con la cadena ligera del factor VIII como con el dominio A3-C1 recombinante. En el panel B, se representan 15 clones seleccionados en micropocillos que contenían CLB-CAG 117 y la cadena ligera del factor VIII. Los clones 31-45 interaccionan con la cadena ligera del factor VIII (barras negras) y con el dominio A3-C1 recombinante (barras en tramas). Este análisis muestra que el fago derivado de los clones 31-45 codifica para fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al dominio A3-C1 del factor VIII.

Estos resultados muestran que el protocolo descrito anteriormente resulta adecuado para la selección de fragmentos de anticuerpos recombinantes que se unen específicamente al dominio A3-C1 del factor VIII. Utilizando los procedimientos dados a conocer en este ejemplo, es posible aislar fagos recombinantes que codifiquen para fragmentos de anticuerpos específicos para el dominio A3-C1 de otros pacientes que presenten inhibidores del factor VIII.

La secuencia de nucleótidos de los fragmentos de cadena pesada variables de 26 clones que reaccionaron específicamente con el dominio A3-C1 recombinante se determinó esencialmente según lo descrito en el ejemplo 4. La secuencia obtenida se alineó con secuencias de la cadena pesada incluidas en la base de datos "V BASE" del MRC Centre of Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Los 26 clones analizados estaban codificados por cuatro segmentos de genes VH distintos DP15, DP31 y DP49 y DP77. La secuencia de aminoácidos de los fragmentos de cadena pesada variables de los clones B38, B18, B35 y B04 se recoge en la figura 9A. En las figuras 9B-E se presenta la secuencia de nucleótidos de estos cuatro clones.

Ejemplo 9

Aislamiento y características de los anticuerpos contra el factor VIII que se unen al dominio A2 del factor VIII

(No forma parte de la presente invención, según las reivindicaciones)

Se ha localizado en el dominio A2 del factor VIII una región inmunodominante que constituye un sitio de unión para los inhibidores del factor VIII (Healey y otros. 1995, J. Biol. Chem. 270: 14505-14509). Hemos caracterizado los anticuerpos contra el factor VIII presentes en el plasma de un paciente con hemofilia A leve y un inhibidor, esencialmente según lo descrito en el ejemplo 1. Los fragmentos de factor VIII recombinantes, correspondientes al dominio A2, A3-C1-C2 y C2 del factor VIII, se marcaron metabólicamente con [^{35}S]-metionina y se utilizaron para la detección de anticuerpos contra el factor VIII presentes en el plasma del paciente. Se observó reactividad con los dominios A2 y A3-C1-C2 marcados metabólicamente, mientras que se observó únicamente una reactividad débil con el dominio C2 marcado metabólicamente (datos no mostrados). Para determinar la capacidad inhibidora tanto de los anticuerpos contra A2 como los anticuerpos contra A3-C1-C2, realizamos experimentos de neutralización. El inhibidor del factor VIII se diluyó hasta alcanzar un valor final de 2 UB/ml y, posteriormente, se añadieron cantidades crecientes de A2 o A3-C1-C2 recombinante. La adición del dominio A2 recombinante tuvo como resultado la neutralización prácticamente completa de los inhibidores del factor VIII presentes en el plasma del paciente. La adición del A3-C1-C2 recombinante sólo neutralizó el inhibidor del factor VIII en cierto grado (<10%). Estos resultados muestran que la mayor parte de los inhibidores del factor VIII están dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII. Hemos evaluado una subclase de los anticuerpos contra el factor VIII mediante un análisis enzimático de adsorción. Ambos anticuerpos contra A2 y contra A3-C1-C2 comprendieron forma predominante la subclase IgG4.

Se utilizaron los linfocitos de sangre periférica del paciente para construir una colección específica de IgG4, según lo descrito en el ejemplo 2. Se obtuvo una colección formada por 1.9×10^6 clones. Se preparó un fago recombinantes que expresa el repertorio de inmunoglobulina específico de IgG4 del paciente según lo descrito en el ejemplo 3. La selección de los fagos con capacidad de unión al dominio A2 del factor VIII se realizó siguiendo uno de los procedimientos descritos a continuación:

1. La cadena pesada del factor VIII purificada (10 $\mu\text{g/ml}$) se inmovilizó en inmunotubos (Nunc, Life Technologies, Breda, Países Bajos) en NaHCO_3 50 mM (pH 9,6). En primer lugar, los fagos recombinantes diluidos en TBS enriquecido con un 3% de HSA se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en inmunotubos no recubiertos. El fago no unido se transfirió a un inmunotubo recubierto con el factor VIII. Tras un lavado intenso (20 veces con TBS/0,1% Tween-20 y 20 veces con TBS), el fago unido se eluyó con trietilamina 100 mM (pH 12). El fago eluido se

ES 2 313 783 T3

neutralizó mediante la adición de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y se utilizó para infectar células *E. coli* TG1, según lo descrito en el ejemplo 3.

2. De forma alternativa, el anticuerpo monoclonal murino CLB-CAg 9, dirigido contra la secuencia de aminoácidos 713-740 del dominio A2 del factor VIII, se inmovilizó en pocillos a una concentración de 5 µg/ml en NaHCO₃ 50 mM (pH 9,6). A continuación, se añadió la cadena pesada del factor VIII purificada (1 µg/ml) y se dejó que se uniese a CLB-CAg 9. Inicialmente, el fago recombinante diluido en TBS con 3% de HSA y 0,5% de Tween 20 se incubó en micropocillos que contenían únicamente CLB-CAg 9 inmovilizado. Tras 2 horas, el fago no unido se transfirió a un micropocillo que contenía la cadena pesada del factor VIII inmovilizada. Se dejó que el fago se uniera a la cadena pesada del factor VIII durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron intensamente (véase la explicación anteriormente) y, finalmente, el fago unido se eluyó con trietilamina 100 mM (pH 12) y se procesó según lo descrito anteriormente.

Tras cuatro rondas de selección, se recogieron los clones individuales y se evaluó la unión del fago recombinante a la cadena pesada del factor VIII mediante un ensayo de adsorción. El anticuerpo monoclonal ESH5 (American Diagnostica, Greenwich, CT, EE.UU.) se inmovilizó en pocillos a una concentración de 5 µg/ml en NaHCO₃ 50 mM (pH 9,6). A continuación, se añadió la cadena pesada del factor VIII (1 µg/ml) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se añadió el fago recombinante, diluido 1 a 1 en Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 1 mM y 2% de HSA y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La cantidad del fago recombinante unido se determinó según lo descrito en el ejemplo 3. Los resultados del análisis se incluyen en la figura 10. Se analizaron 20 clones que se habían seleccionado en pocillos en los que se había inmovilizado la cadena pesada del factor VIII mediante CLB-CAg 9. Once de los 20 clones se unieron específicamente a la cadena pesada del factor VIII (figura 10A). Asimismo, se analizaron clones que se seleccionaron mediante la cadena pesada del factor VIII en inmunotubos. Quince de los 20 clones se unieron específicamente a la cadena pesada del factor VIII (figura 10B). Estos resultados muestran que el protocolo descrito anteriormente permite aislar los anticuerpos contra el factor VIII dirigidos contra la cadena pesada (A1-A2) del factor VIII. Utilizando los procedimientos dados a conocer en este ejemplo, es posible aislar los anticuerpos contra el factor VIII del repertorio de otros pacientes que presenten inhibidores del factor VIII dirigidos contra el dominio A2.

La secuencia de nucleótidos de los fragmentos de cadena pesada variables de 26 clones que reaccionaron específicamente con la cadena pesada del factor VIII se determinó esencialmente según lo descrito en el ejemplo 4. La secuencia obtenida se alineó con secuencias de la cadena pesada incluidas en la base de datos "V BASE" del MRC Centre of Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Los 26 clones analizados estaban codificados por dos segmentos de genes VH distintos DP10 y DP47 (figura 11A). En las figuras 11B y C se incluyen la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable de estos clones.

Ejemplo 10

Los fragmentos de anticuerpos recombinantes específicos contra el factor VIII pueden neutralizar la actividad de los inhibidores del factor VIII presentes en el plasma de pacientes con hemofilia A

En el ejemplo 7, hemos mostrado que scFv-EL14 y scFv-IT2 neutralizan la actividad inhibidora del anticuerpo monoclonal murino CLB-CAg 117. Hemos investigado si scFv-EL14 también es capaz de neutralizar los inhibidores del factor VIII presentes en el plasma de los pacientes con hemofilia A. Inicialmente, evaluamos el plasma del paciente con hemofilia adquirida del que se habían derivado los fragmentos de anticuerpos recombinantes. Según lo descrito en el ejemplo 1, el dominio C2 fue capaz de neutralizar el 20% del inhibidor del factor VIII presente en el plasma del paciente (tabla III). El efecto de scFv-EL14 se evaluó mediante un ensayo similar. Se diluyó el plasma hasta un volumen final de 2 UB/ml y se añadieron cantidades crecientes de scFv-EL14. ScFv-EL14 fue capaz de neutralizar aproximadamente el 20% de la actividad total del inhibidor del factor VIII presente en el plasma del paciente. Estos resultados sugieren que el scFv dirigido contra el dominio C2 previene la unión de los anticuerpos inhibidores del factor VIII que se unen al dominio C2 del factor VIII.

Seguidamente, evaluamos dos muestras de plasma procedentes de pacientes con hemofilia A congénita e inhibidores del factor VIII. La contribución relativa del dominio C2 a la cantidad total del inhibidor del factor VIII para ambas muestras se encontró comprendida entre el 40% y el 90%. Los experimentos de neutralización indican que la adición de concentraciones crecientes de scFv-EL14 conducen a una reducción significativa de los niveles de inhibidor del factor VIII presentes en el plasma de estos dos pacientes con hemofilia A congénita. Estos resultados confirman que scFv-EL14 reduce la unión de los inhibidores del factor VIII humano al dominio C2. Nuestros descubrimientos revelan que scFv-EL14 protege los sitios antigénicos que están presentes en el dominio C2 del factor VIII. Esta propiedad del scFv-EL14 se puede utilizar para evitar la unión de los inhibidores del factor VIII al dominio C2 del factor VIII administrado a pacientes con hemofilia A que presentan un inhibidor. Se ha determinado firmemente que los inhibidores del factor VIII reconocen con frecuencia varios epítomos que se han localizado en el dominio A2, A3 y C2 del factor VIII. En este ejemplo, se describe la actividad neutralizante ejercida por el scFv-EL14 específico del dominio C2 sobre la actividad biológica de los inhibidores del factor VIII.

En los ejemplos 8 y 9, hemos dado a conocer procedimientos para la obtención de anticuerpos recombinantes que reaccionan específicamente con el dominio A3-C1 y la cadena pesada (A1-A2) del factor VIII. En este ejemplo, hemos mostrado que los anticuerpos recombinantes dirigidos contra el dominio C2 del factor VIII son capaces de proteger

ES 2 313 783 T3

los sitios antigénicos del factor VIII. De igual forma, se puede evaluar la capacidad de los anticuerpos contra A3-C1 y de los anticuerpos contra A2 descritos en los ejemplos 8 y 9 para competir con los inhibidores del factor VIII por la unión al factor VIII. Los anticuerpos contra A3-C1 y contra A1-A2 dados a conocer en la presente invención también se pueden utilizar para el tratamiento de pacientes que presenten inhibidores que reaccionen con el dominio A3-C1 y/o con el dominio A1-A2. Tabla I: Secuencias de nucleótidos de clones que expresan los anticuerpos recombinantes con especificidad por la cadena ligera del factor VIII. Basándose en la secuencia de nucleótidos, 55 de los 60 clones analizados podrían ordenarse según se muestra a continuación. En la primera columna, los clones con la misma secuencia de nucleótidos se ordenan en cuatro grupos. El número de clones correspondientes este grupo se indica entre paréntesis. Los clones EL5, EL25 y IT2 están relacionados, según se indica en la figura 4B. En la segunda columna, se muestra la familia de cadena pesada a la que pertenecen estos clones. Todos los clones analizados pertenecen a la familia VH1. En la tercera columna, se muestra el segmento de estirpe bacteriana. Los clones EL5, EL25 y IT2 pertenecen al segmento de estirpe bacteriana DP-14, mientras que el clon EL14 pertenece a la secuencia de estirpe bacteriana DP-10. En la cuarta columna, se muestra el número de mutaciones de los distintos clones. El primer número corresponde al número de mutaciones de nucleótidos, mientras que el segundo corresponde al número de cambios de aminoácidos. La secuencia se compararon con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los segmentos de estirpe bacteriana indicados en la tabla.

Clon	Familia VH	Segmento de estirpe bacteriana	Mutaciones
EL5 (3)	VH1	DP-14	20/12
EL14 (14)	VH1	DP-10	18/12
EL25 (5)	VH1	DP-14	19/11
IT2 (33)	VH1	DP-14	20/13

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de EL-14 o IT-2 representadas en la figura 4A, siendo dicho polipéptido capaz de neutralizar la actividad inhibidora de los anticuerpos inhibidores del factor VIII, sin interferir con la actividad procoagulante del factor VIII.
2. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es un fragmento Fv de cadena sencilla.
- 10 3. Polipéptido, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho polipéptido es un anticuerpo.
4. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho polipéptido se une específicamente a la cadena ligera del factor VIII.
- 15 5. Polipéptido, según la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido se une específicamente a una región de la cadena ligera del factor VIII consistente en el dominio A3, en el dominio C1 y en el dominio C2 del factor VIII.
6. Composición farmacéutica para el tratamiento de la inhibición del factor VIII en un humano, que comprende un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Composición farmacéutica, según la reivindicación 6, que además contiene factor VIII.
8. Utilización de un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la inhibición del factor VIII en un humano.
- 25 9. Polinucleótido en forma sustancialmente aislada, que codifica para un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. Procedimiento para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende la preparación de un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido, la preparación de un vector recombinante que contiene dicho polinucleótido unido de forma funcional a una secuencia de control capaz de promover la expresión del polinucleótido por parte de una célula huésped, la transformación de una célula huésped mediante dicho vector recombinante, el cultivo de dicha célula huésped en condiciones que promuevan la expresión del polinucleótido, en el que dicho polinucleótido codifica para un polipéptido, según una de las reivindicaciones 1-5.
- 30 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, que además comprende el aislamiento del polipéptido producido.
12. Procedimiento para obtener un fragmento de anticuerpo recombinante específico contra el factor VIII adecuado para su utilización en el tratamiento de pacientes que presenten anticuerpos inhibidores dirigidos contra el factor VIII, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 35 a) obtención de un fragmento de anticuerpo específico contra el factor VIII dirigido contra el factor VIII;
- b) selección de un fragmento de anticuerpo capaz de competir con la unión al factor VIII de un anticuerpo monoclonal inhibidor del factor VIII; y
- 45 c) selección de un fragmento de anticuerpo cuya unión al factor VIII no interfiera con la actividad procoagulante del factor VIII.
- 50
- 55
- 60
- 65

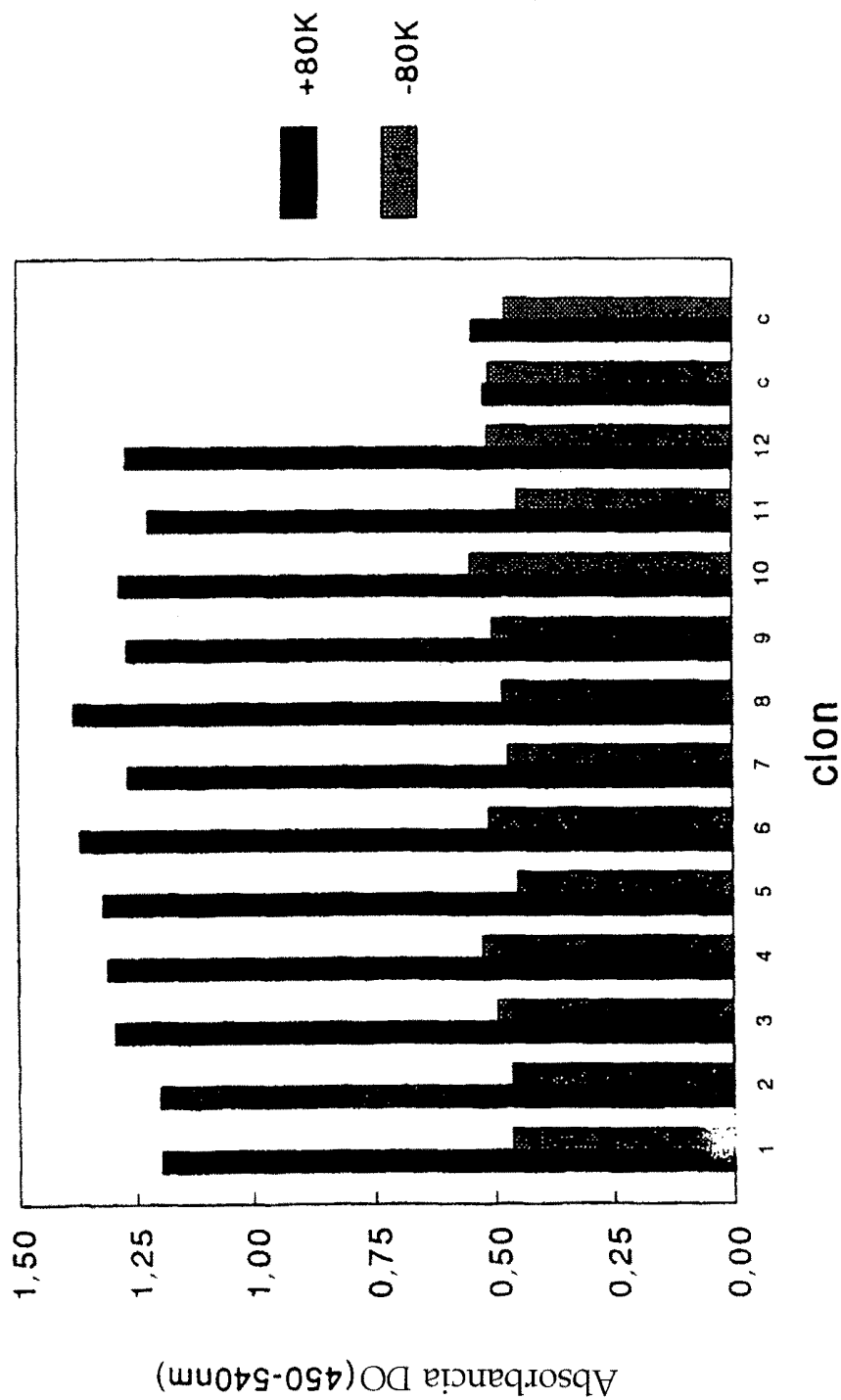


Figura 1

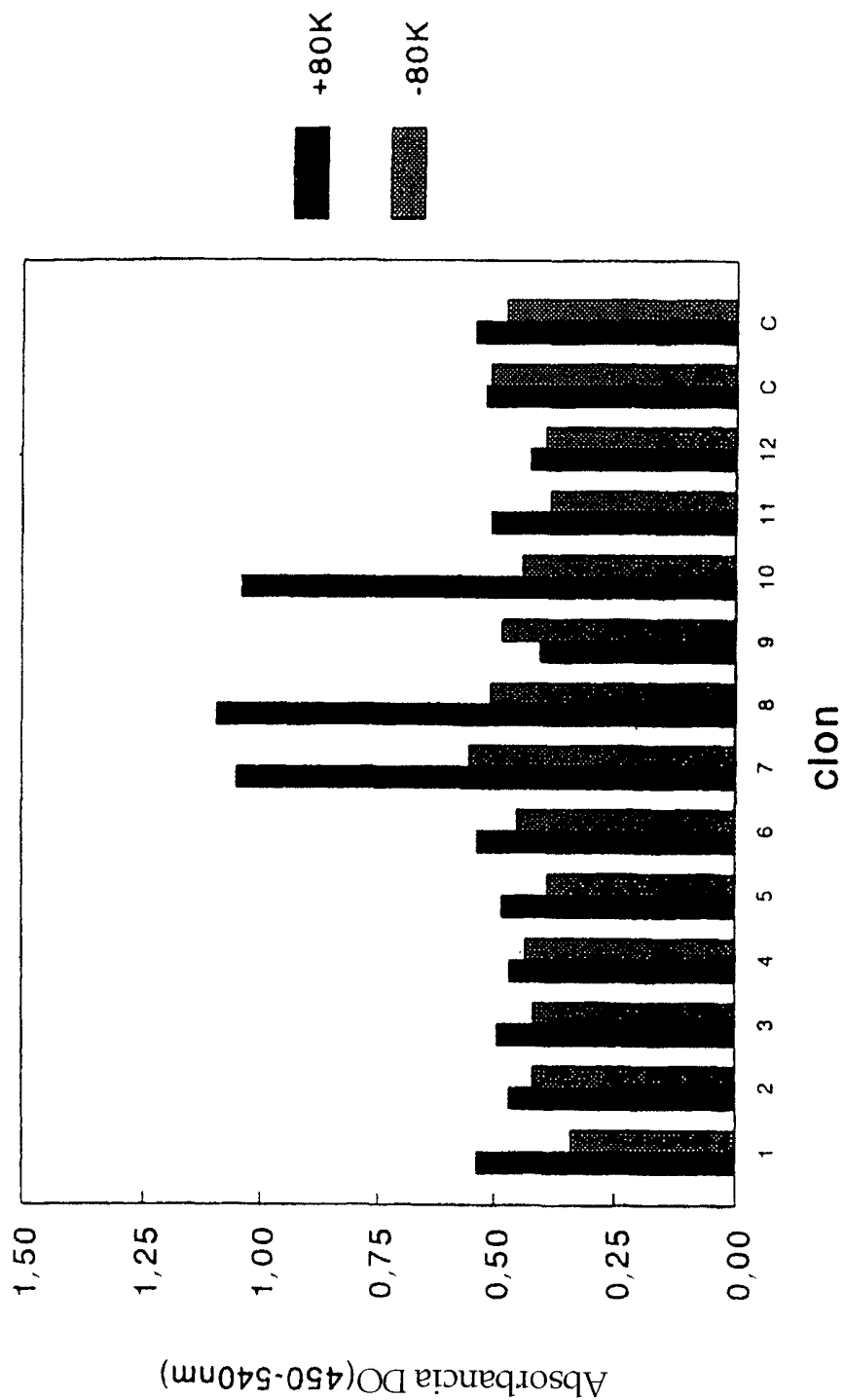


Figura 2

CDR3

EL-14	QQNGGWYEGPILLEPRPD--ALDI
	.
IT-2	DGGGAYEDVWSGEYPEYYAMDV

Figura 4C

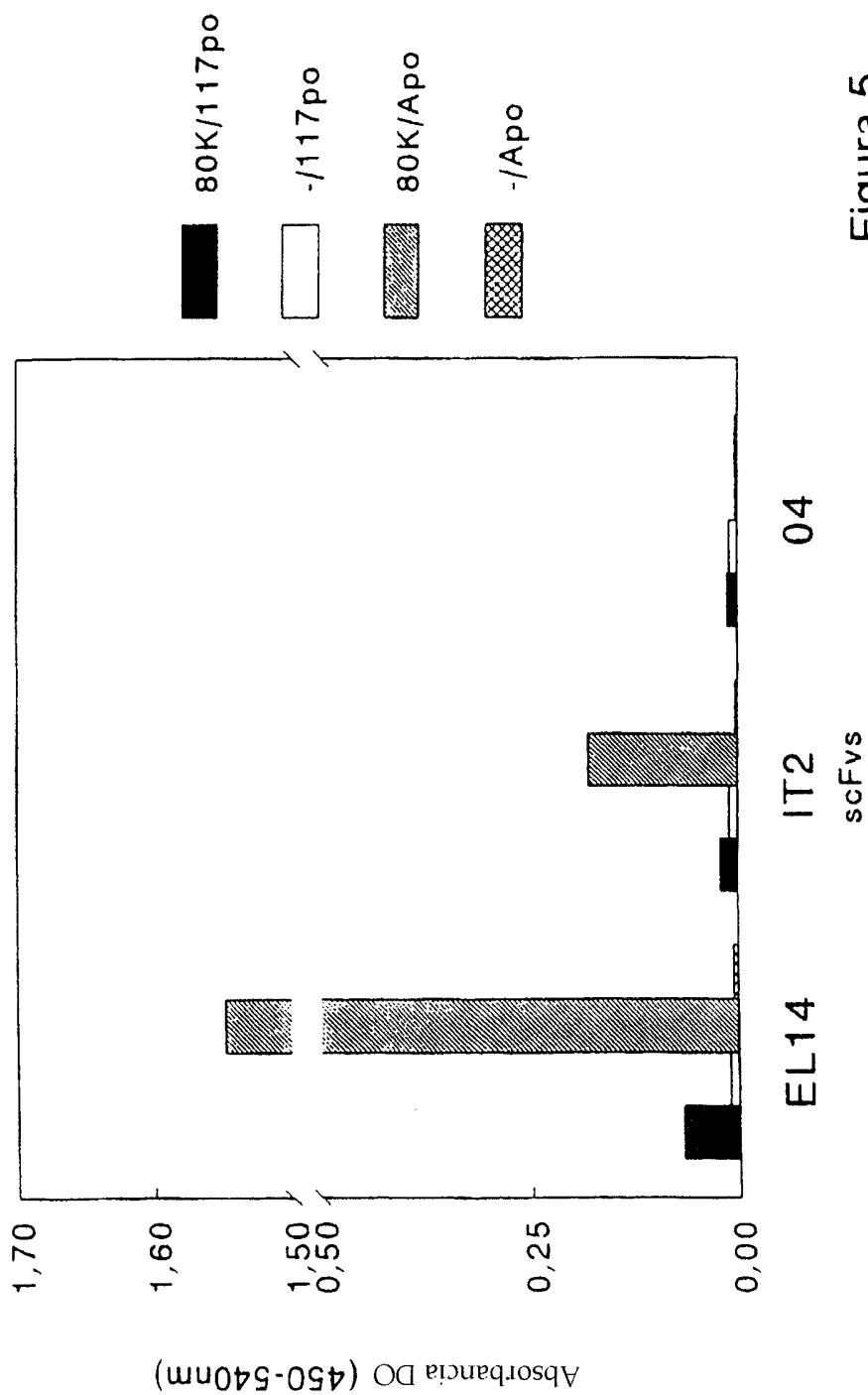


Figura 5

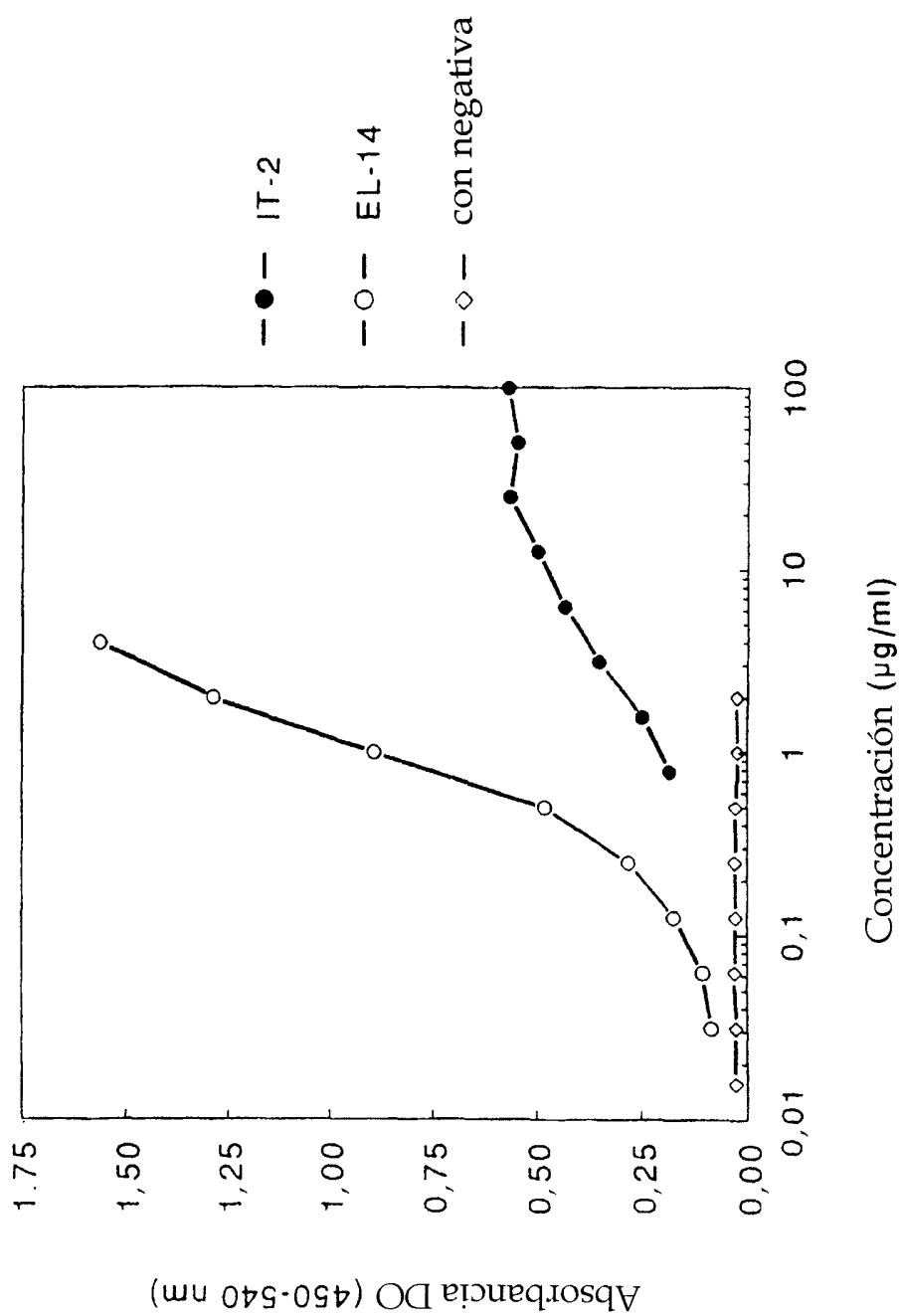


Figura 6

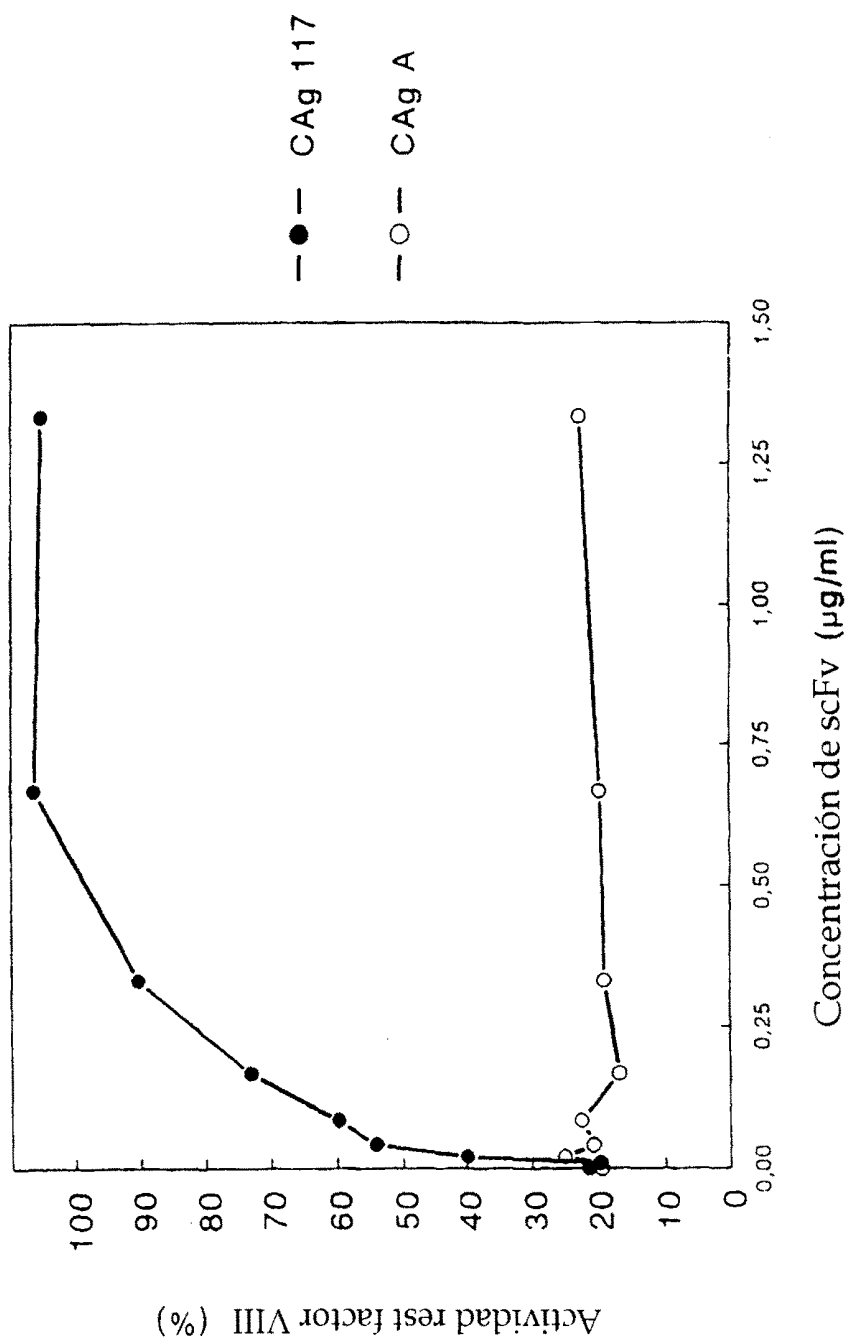


Figura 7A NEUTRALIZACIÓN POR scFv EL-14

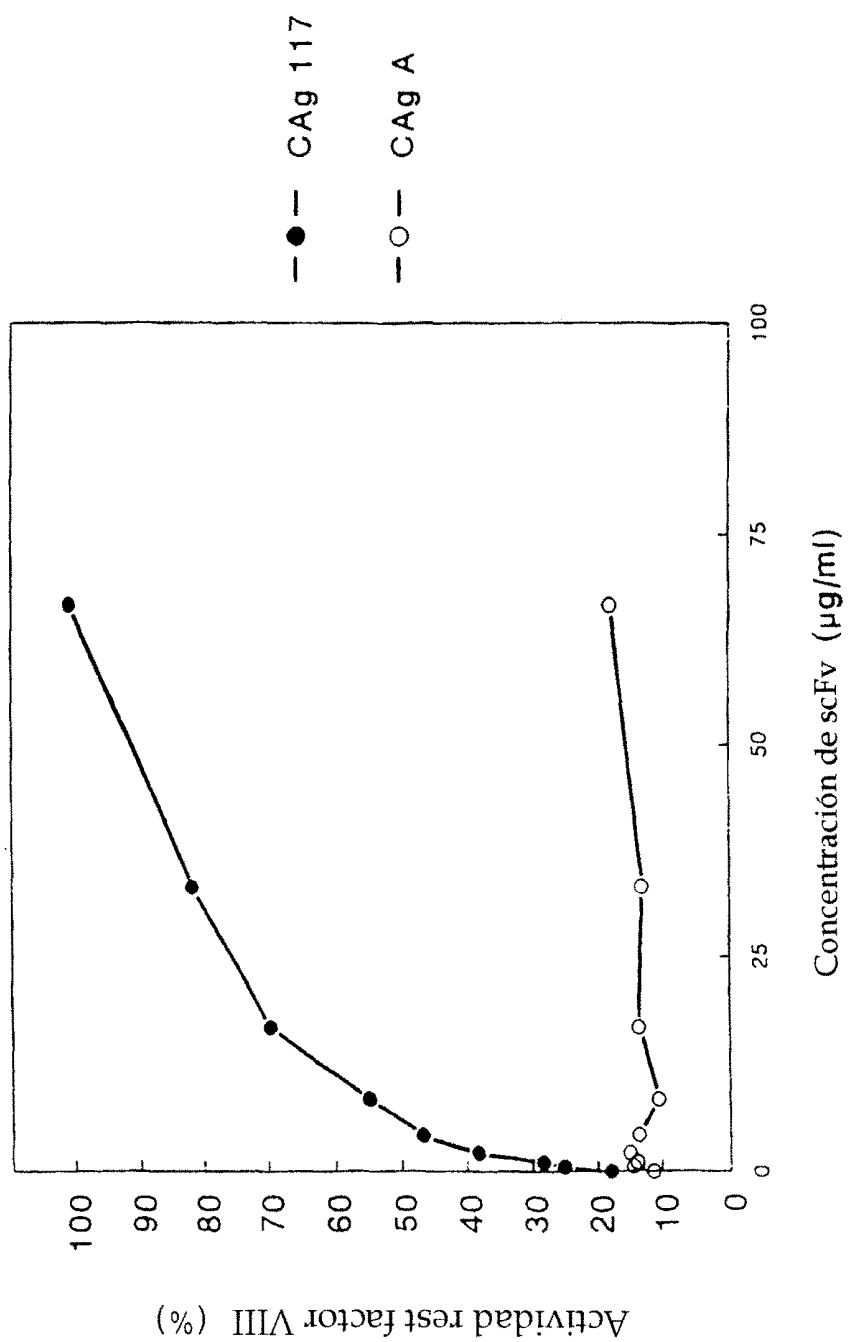


Figura 7B NEUTRALIZACIÓN POR scFv IT-2

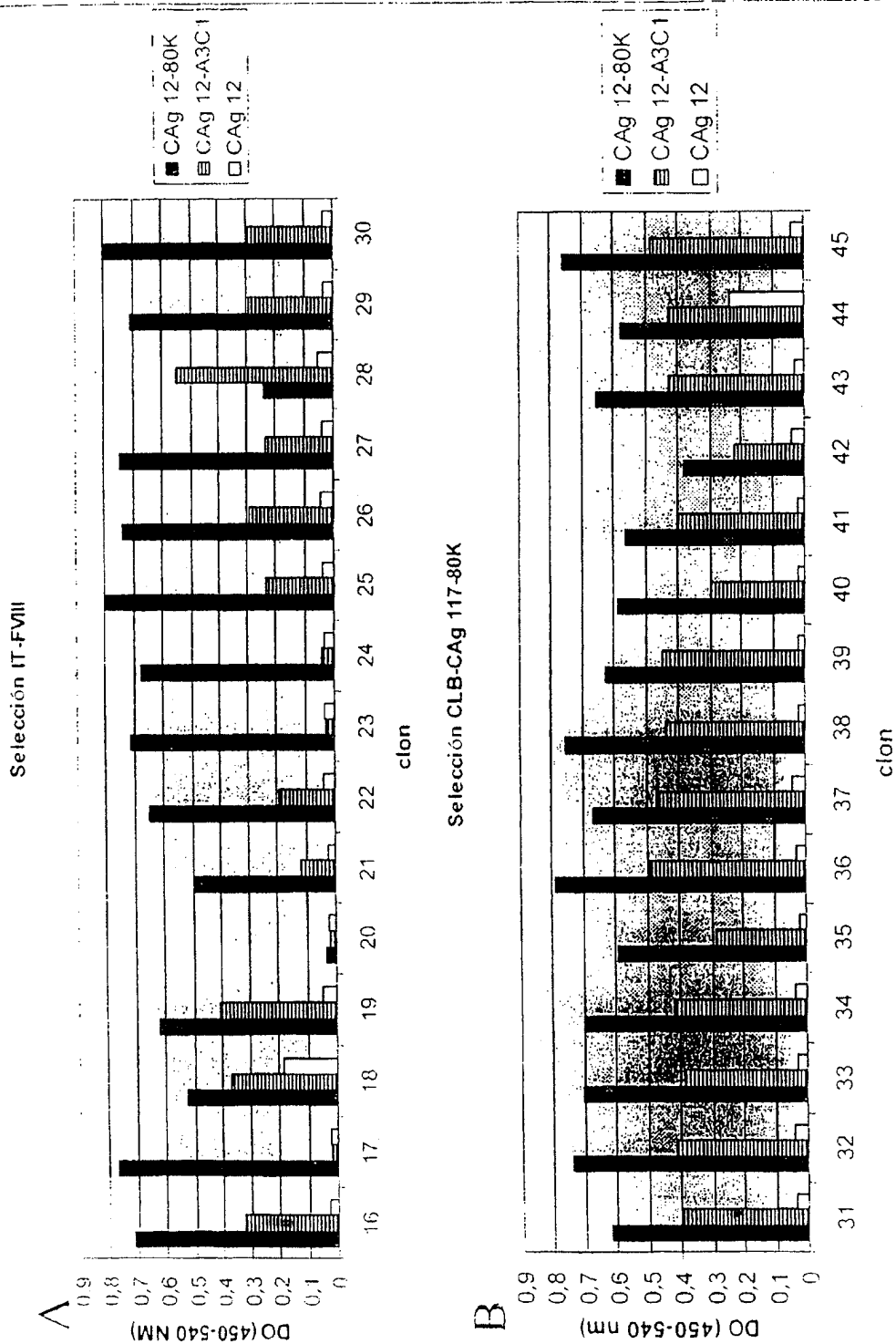


Figura 8

Secuencias de proteínas deducidas del scFv específico de A3-C1 del FVIII aislado

Cadenas pesadas		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DP-15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	SYDIN	WVRQATGQGLEHNG	WMNPNSGNTGYAQKFOG	RVTMTRENTSISTAYMELSSRSEDTA	VYYCAR							
B38L..YA-D.....T.....I.....A..F.....K..-L..L--D--T.....RN..E.....
DP-31	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSLSCAASGFTFD	DYAMH	WVRQAFPKGKLEHVS	GISWNSGSGIGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTA	LYYCAK D							
B18	Q.....Q.....K.....C.....I.....E.....VT..SGTT..F.....Y.....L..PYINSSNYRRGVAAAFDI
DP-49	QVQLVESGGGVQPGRSLRLSLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAFPKGKLEHVA	VISYDGSNKYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTA	VYYCAK							
B35	E.....L.....L.....VD--L--L--A.....A.....ND.....TI.....
DP-17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAFPKGKLEHVS	SISSSSYIYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTA	VYYCAR							
B04K--E.....R..R..DIH.....T.....GGN--D.....M--F--

Figura 9A

ES 2 313 783 T3

-1 -Gln- -Val- -Gln- -Leu- -Leu- -Gln- -Ser- -Ala- -Ala- -Asp- -Val- -Lys- -Lys- -Pro- -Gly- -Ala- -Ser-
 CAGGTGCAGC TGTTGCAGTC TGCAGCTGAC GTGAAGAAGC CTGGGGCCTC 50
 GTCCACGTCG ACAACGTCAG ACGTCGACTG CACTTCTTCG GACCCCGGAG

-1 -Val- -Lys- -Val- -Ser- -Cys- -Thr- -Ala- -Ser- -Gly- -Tyr- -Ile- -Phe- -Thr- -Ser- -Tyr- -Asp- -Ile-
 AGTGAAGGTC TCCTGTACGG CTTCTGGATA CATCTTCACC AGTTATGATA 100
 TCACTTCCAG AGGACATGCC GAAGACCTAT GTAGAAGTGG TCAATACTAT

-1 -Asn- -Trp- -Val- -Arg- -Gln- -Ala- -Thr- -Gly- -Gln- -Gly- -Leu- -Glu- -Trp- -Met- -Gly- -Trp-
 TCAACTGGGT GCGACAGGCC ACTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGATGG 150
 AGTTGACCCA CGCTGTCCGG TGACCTGTTC CCGAACTCAC CTACCCTACC

-1 -Met- -Asn- -Pro- -Asn- -Ser- -Gly- -Asp- -Ala- -Gly- -Phe- -Ala- -Gln- -Lys- -Phe- -Lys- -Gly- -Arg-
 ATGAATCCTA ACAGTGGTAA CGCAGGCTTT GCACAGAAGT TTAAGGGCAG 200
 TACTTAGGAT TGTCACCATT GCGTCCGAAA CGTGTCTTCA AATTCCCGTC

+1 -Leu- -Thr- -Leu- -Thr- -Arg- -Asp- -Thr- -Ser- -Thr- -Ser- -Thr- -Ala- -Tyr- -Met- -Glu- -Leu- -Arg-
 ACTCACCTTG ACCAGGGACA CTTCCACAAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA 250
 TGAGTGGAAC TGGTCCCTGT GAAGGTGTTC GTGTCGGATG TACCTCGACT

+1 -Arg- -Leu- -Glu- -Ser- -Glu- -Asp- -Thr- -Ala- -Val- -Tyr- -Tyr- -Cys- -Ala- -Arg- -Cys- -Asp-
 GGAGACTGGA ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATGTGAC 300
 CCTCTGACCT TAGACTCCTG TGCCGGCACA TAATGACACG CTCTACACTG

-1 -Thr- -Thr- -Leu- -Leu- -Ile- -Trp- -Phe- -Gly- -Pro- -Ala- -Pro- -Tyr- -Tyr- -Asp- -Ser- -Trp- -Gly-
 ACCCACTCT TAATCTGGTT CGGGCCCCGCC CCCTACTATG ACTCCTGGGG 350
 TGGTGTGAGA ATTAGACCAA GCCCGGGCGG GGGATGATAC TGAGGACCCC

-1 -Gln- -Gly- -Thr- -Leu- -Val-
 CCAGGGA ACT CTAGTC 400
 GGTCCTTGA GATCAG

Figura 9B

ES 2 313 783 T3

*1 :Gln, Val, Gln, Leu, Val, Gln, Ser, Gly, Gly, Gly, Leu, Val, Gln, Pro, Gly, Lys, Ser-
 CAGGTGCAAC TGGTGCAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGCAAGTC 50
 GTCCACGTTG ACCACGTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCC GACCCTTCAG

*2 :Leu, Arg, Leu, Ser, Cys, Ala, Ala, Ser, Gly, Phe, Thr, Phe, Gly, Asp, Tyr, Ala, Ile-
 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACATTTGGC GATTATGCCA 100
 GGACTIONTGG AGGACACGTC GGAGACCTAA GTGTAAACCG CTAATACGGT

*3 :His, Trp, Val, Arg, Gln, Ala, Pro, Gly, Glu, Gly, Leu, Glu, Trp, Val, Ser, Gly,
 TACACTGGGT CCGGCAAGCT CCAGGGGAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGGT 150
 ATGTGACCCA GGCCGTTCCG GGTCCCTCC CGGACCTCAC CCAGAGTCCA

*4 :Val, Thr, Trp, Ser, Gly, Thr, Thr, Ile, Gly, Phe, Ala, Asp, Ser, Val, Lys, Gly, Arg-
 GTTACTTGGG GTGGTACTAC TATAGGCTTT GCGGACTCTG TGAAGGGCCG 200
 CAATGAACCT CACCATGATG ATATCCGAAA CGCCTGAGAC ACTTCCCGGC

*5 :Phe, Thr, Ile, Ser, Arg, Asp, Asn, Ala, Lys, Asn, Ser, Leu, Tyr, Leu, Tyr, Met, Asn
 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA TTCCCTGTAT CTGTACATGA 250
 TAAGTGGTAG AGGTCTCTGT TGCCGGTCTT AAGGGACATA GACATGTACT

*6 :Ser, Leu, Arg, Ala, Glu, Asp, Thr, Ala, Leu, Tyr, Tyr, Cys, Ala, Leu, Pro, Tyr,
 ACAGTCTGAG AGCTGAAGAC ACGGCCTTGT ATTATTGTGC CTTACCATAT 300
 TGTCAGACTC TCGACTTCTG TGCCGGAACA TAATAACACG GAATGGTATA

*7 :Ile, Asn, Ser, Ser, Asn, Tyr, Arg, Arg, Gly, Val, Ala, Ala, Phe, Asp, Ile, Trp, Gly-
 ATCAACTCGT CCAACTACAG AAGAGGGGTC GCTGCCTTCG ATATCTGGGG 350
 TAGTTGAGCA GGTGATGTC TTCTCCCCAG CGACGGAAGC TATAGACCCC

*8 :Gln, Gly, Thr, Met, Val, Thr, Val, Ser, Ser,
 CCAAGGGACA ATGGTCACCG TGTCGAGT 400
 GGTCCCTGT TACCAGTGGC ACAGCTCA

Figura 9C

ES 2 313 783 T3

```

-1 -Glu- Val- Gln- Leu- Val- Glu- Ser- Gly- Gly- Gly- Leu- Val- Gln- Pro- Gly- Arg- Ser-
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGAGGTC 50
CTCCACGTCG ACCACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTGC GACCCTCCAG

-1 -Leu- Arg- Leu- Ser- Cys- Val- Asp- Ser- Gly- Leu- Thr- Phe- Ser- Ser- Tyr- Gly- Met
CCTGAGACTC TCCTGTGTAG ACTCTGGACT CACCTTCAGT AGTTATGGCA 100
GGACTCTGAG AGGACACATC TGAGACCTGA GTGGAAGTCA TCAATACCGT

-1 -His- Trp- Val- Arg- Gln- Ala- Pro- Gly- Ala- Gly- Leu- Glu- Trp- Val- Ala- Val-
TGCCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGCGCGG GGCTGGAGTG GGTGGCCGTT 150
ACGTGACCCA GCGGGTCCGA GGTCCGCGCC CCGACCTCAC CCACCGGCAA

-1 -Ile- Ser- Tyr- Asp- Gly- Asn- Asp- Lys- Tyr- Tyr- Ala- Asp- Ser- Val- Lys- Gly- Arg-
ATTTCATACG ACGGAAATGA TAAATATTAT GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200
TAAAGTATGC TGCCTTTACT ATTTATAATA CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC

-1 -Phe- Ala- Ile- Ser- Arg- Asp- Asn- Ala- Lys- Asn- Thr- Leu- Tyr- Leu- Gln- Met- Asn
ATTCGCCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA 250
TAAGCGGTAG AGGTCTCTGT TACGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT

-1 -Ser- Leu- Thr- Ile- Glu- Asp- Thr- Ala- Val- Tyr- Tyr- Cys- Ala- Lys- Asp- Leu-
ACAGCCTGAC AATAGAGGAC ACGGCTGTCT ATTATTGTGC GAAAGATCTC 300
TGTCGGACTG TTATCTCCTG TGCCGACAGA TAATAACACG CTTTCTAGAG

-1 -Ile- Glu- Ser- Asn- Ile- Ala- Glu- Ala- Leu- Trp- Gly- Gln- Gly- Thr- Leu- Val- Thr-
ATAGAATCAA ATATTGCGGA GGCCCTCTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC 350
TATCTTAGTT TATAACGCCT CCGGGAGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG

-1 -Val- Ser- Ser-
CGTGTCGAGT 400
GCACAGCTCA

```

Figura 9D

ES 2 313 783 T3

```

*1 :Glu Val Gln Leu Val Lys Ser Gly Glu Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser-
GAGGTGCAGC TGGTGAAGTC TGGGGAAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50
CTCCACGTCG ACCACTTCAG ACCCCTTCG GACCAGTTCG GACCCCCAG

*2 :Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr Asp Ile-
CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGG AGATATGATA 100
GGACTCTGAG AGGACACGTC GGAGACCTAA GTGGAAGTCC TCTATACTAT

*3 :His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser-
TCCACTGGGT CCGCCAGACT CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCATCC 150
AGGTGACCCA GCGGTCTGA GGTCCCTTCC CGGACCTCAC CCAGAGTAGG

*4 :Ile Ser Ser Gly Gly Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg-
ATCAGTAGTG GTGGTAATTA CATAGACTAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG 200
TAGTCATCAC CACCATTAAT GTATCTGATG CGTCTGAGAC ACTTCCGGC

*5 :Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Val Val Tyr Leu Gln Met Asn
ATTCAACATC TCCAGAGACA ACGCCAACAA TGTTGTCTAT CTACAAATGA 250
TAAGTGGTAG AGGTCTCTGT TCGGTTGTT ACAACAGATA GATGTTTACT

*6 :Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly
ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ATGGCTGTCT ATTTCTGTGC GAGAGATGGG 300
TGTCGGACTC TCGGTCCTG TACCGACAGA TAAAGACACC CTCTCTACCC

*7 :Thr Ile Phe Gly Ser Ala Ala Thr Trp Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Arg-
ACGATTTTTG GATCGGCGGC GACCTGGCGG GCTTTTGATA TCTGGGGCCG 350
TGCTAAAAAC CTAGCCGCCG CTGGACCGCC CGAAAACATAT AGACCCCGGC

*8 :Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser-
GGGGACAATG GTCACCGTGT CGAGT 400
CCCCTGTTAC CAGTGGCACA GCTCA

```

Figura 9E

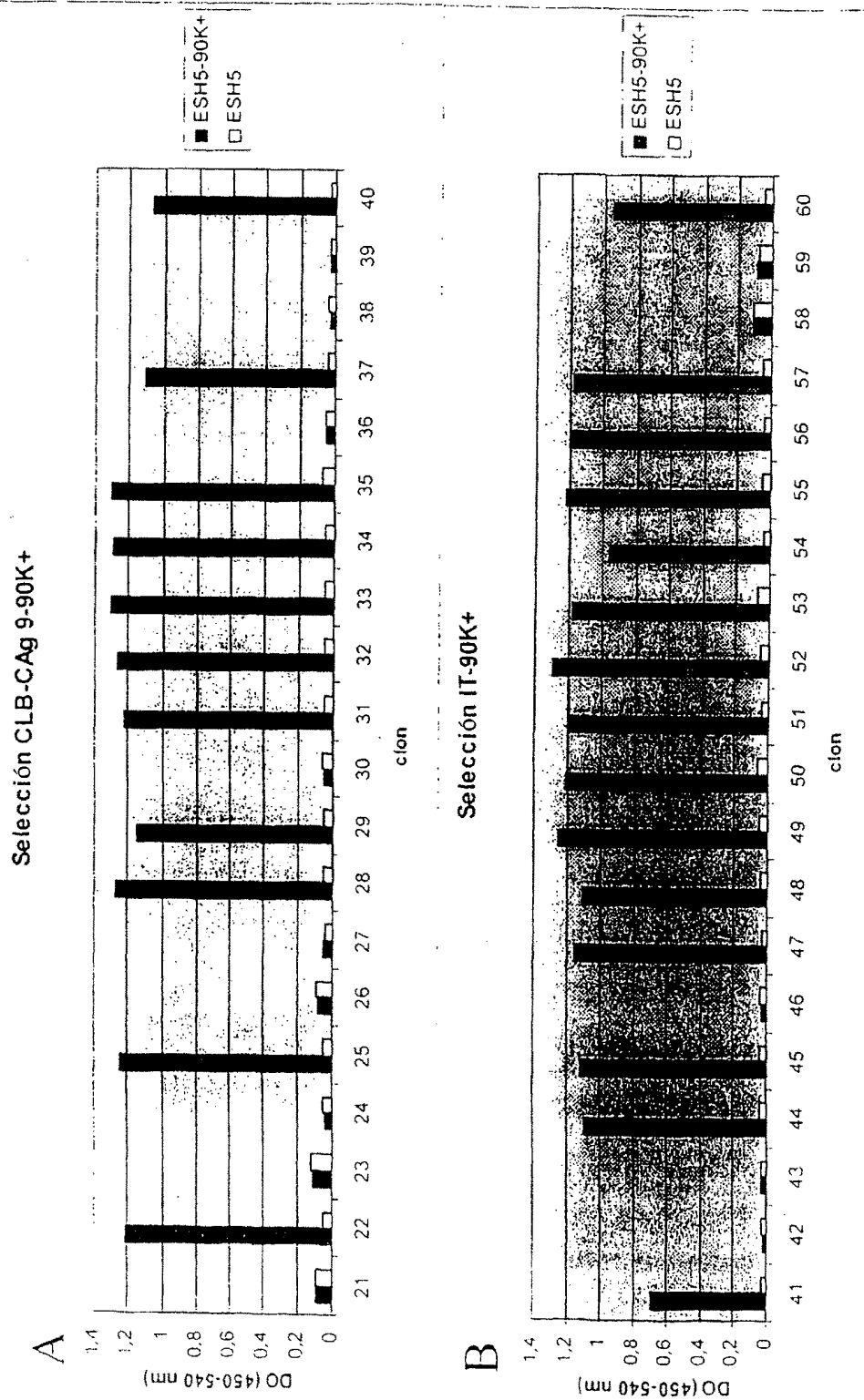


Figura 10

ES 2 313 783 T3

*1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
 CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCCTC 50
 GTCCACGTCG ACCACGTCAG ACCCCGACTC CACTTCTTCG GACCCAGGAG

*2 Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser His Ala Ile
 GGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AGTCATGCTA 100
 CCACTTCCAG AGGACGTTCC GAAGACCTCC GTGGAAGTCG TCAGTACGAT

*3 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp
 TCAGCTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGAC 150
 AGTCGACCCA CGCTGTCCGG GGACCTGTTC CCGAACTCAC CTACCCTCTG

*4 Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Gly Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg
 ATCATCCCTA TCCTTGGTAC AGGAAACTAC GCACAGAAGT TCCAGGGCAG 200
 TAGTAGGGAT AGGAACCATG TCCTTTGATG CGTGTCTTCA AGGTCCCGTC

*5 Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 AGTCACGATT ACCGCGGACG AGTCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA 250
 TCAGTGCTAA TGGCGCCTGC TCAGGTGCTC GTGTCCGATG TACCTCGACT

*6 Thr Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Glu Leu Asp Trp
 GCACCCTGAC ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGA ACTTGACTGG 300
 CGTGGGACTG TAGACTCCTG TGCCGGCACA TAATGACACT TGAACTGACC

*7 Phe Tyr Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 TTCTATATCT GGGGCCAAGG GACAATGGTC ACCGTGTCGA GT 350
 AAGATATAGA CCCCAGTTCC CTGTTACCAG TGGCACAGCT CA

Figura 11B

ES 2 313 783 T3

*1 -Glu- Val- Gln- -Leu- Val- Glu- -Ser- Gly- Gly- Asp- -Leu- Val- Gln- -Pro- Gly- Gly- -Ser-
 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGAC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC 50
 CTCCACGTCG ACCACCTCAG ACCCCCTCTG AACCATGTTCG GACCCCCCAG

*1 -Leu- Arg- Leu- -Ser- Cys- Ala- Ala- -Ser- Gly- -Phe- Thr- Phe- Ser- Asn- Phe- Ala- Met
 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AACTTTGCCA 100
 GGACTCTGAG AGGACACGTC GGAGACCTAA GTGGAAATCG TTGAAACGGT

*1 -Ser- Trp- Val- -Arg- Gln- Ala- -Pro- Gly- Lys- Gly- Leu- Glu- Trp- Val- Ala- Ala-
 TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCCGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCGCGGCT 150
 ACTCGACCCA GCGGTCCGA GGGCCCTTCC CCGACCTCAC CCAGCGCCGA

*1 Ile- Gly- Gly- -Arg- -Ser- Gly- Thr- Thr- Phe- Tyr- Ala- Asp- Ser- Val- Lys- Gly- Arg-
 ATTGGCGGTA GAAGTGGTAC CACATTCTAC GCGGACTCCG TGAAGGGCCG 200
 TAACCGCCAT CTTACCATG GTGTAAGATG CGCCTGAGGC ACTTCCCGGC

*1 Phe- Thr- Ile- -Ser- Arg- Asp- Asn- Ser- Lys- Asn- Thr- Val- Tyr- Leu- Glu- Met- Asn
 GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGGTCTAT CTGGAAATGA 250
 CAAGTGGTAG AGGTCTCTGT TAAGGTTCTT GTGCCAGATA GACCTTTACT

*1 Ser- Leu- Arg- Ala- Glu- Asp- Thr- Ala- Ile- Tyr- Tyr- Cys- Ala- Lys- Arg- Gly-
 ACAGTCTGAG AGCCGAGGAC ACAGCCATTT ATTACTGTGC GAAAAGAGGG 300
 TGTCAGACTC TCGGCTCCTG TGTCGGTAAA TAATGACACG CTTTTCTCCC

*1 Arg- Gly- Gly- Tyr- Lys- Tyr- Tyr- Gly- Met- Asp- Val- Trp- Gly- Gln- Gly- Thr- Thr-
 CGCGGGGGGT ATAAGTATTA TGGGATGGAC GTCTGGGGCC AGGGGACCAC 350
 GCGCCCCCA TATTCATAAT ACCCTACCTG CAGACCCCGG TCCCCTGGTG

*1 Val- Thr- Val- -Ser- Ser-
 GGTACCCGTG TCGAGT 400
 CCAGTGGCAC AGCTCA

Figura 11C