(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 372 811**

(51) Int. CI.:

| | |
|---|---|
| ***C12N 15/12*** | (2006.01) |
| ***C07K 14/755*** | (2006.01) |
| ***C07K 16/36*** | (2006.01) |
| ***C07K 16/42*** | (2006.01) |
| ***A61K 38/37*** | (2006.01) |
| ***A61K 39/395*** | (2006.01) |
| ***G01N 33/53*** | (2006.01) |

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **02732243 .7**

(96) Fecha de presentación: **06.05.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1399556**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

(54) Título: **EPÍTOPOS ANTIGÉNICOS DEL FACTOR VIII, INHIBIDORES DIRIGIDOS CONTRA DICHOS EPÍTOPOS Y USO DE LOS MISMOS.**

(30) Prioridad:
**09.05.2001 US 853080**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**26.01.2012**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**26.01.2012**

(73) Titular/es:
**CAF - DCF CVBA - SCRL**
**DÉPARTEMENT CENTRAL DE FRACTIONNEMENT DE LA CROIX-ROUGE**
**AVENUE DE TYRAS, 109**
**1120 BRUSSELS, BE**

(72) Inventor/es:
**LAUB, Ruth y**
**DI GIAMBATTISTA, Mario**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Epítopos antigénicos del factor VIII, inhibidores dirigidos contra dichos epítopos y uso de los mismos

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a las secuencias de polipéptidos antigénicos (epítopos) del factor VIII, a los inhibidores anti-FVIII que se dirigen contra estas secuencias y a los anti-inhibidores que se dirigen contra dichos inhibidores anti-FVIII.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica y a un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una de las moléculas mencionadas anteriormente.

**Antecedentes técnicos que subyacen a la invención**

FVIII es una proteína multidominio grande de 2.332 aminoácidos constituida por tres dominios estructurales, A, B y C que se disponen en el orden A1:a1:A2:a2:B:a3:A3:C1:C2. Los dominios A poseen más del 40% de homología y son también homólogos a ceruloplasmina (para una revisión reciente, véase Pratt (2000) y Saenko (1999)). También existe un 30% de homología entre los dominios A del factor V y FVIII. El dominio C aparece dos veces y se ha notificado que puede unirse a glicoconjugados y fosfolípidos que tienen una carga negativa neta. Muestra homología con lectinas que pueden unirse a fosfolípidos cargados negativamente. Se ha ubicado en esta región el sitio de unión plaquetaria (dominio C2) (Foster *et al.*, (1990)).

Estos determinantes antigénicos consisten en los fragmentos 351-365 (dominio A1 - cadena pesada), 713-740 (dominio A2), 1670-1684 (dominio A3 – cadena ligera) (extremo $NH_2$ de la cadena ligera) o además 2303-2332 (dominio C2 - cadena ligera) (Foster C, (1990)), los fragmentos 701-750, 1663-1689, 330-472, 1694-1782 (documento EP-0 202 853), 322 - 740 y 2170 - 2322.

La patente estadounidense 5.744.446 describe un factor VIII híbrido de ser humano/animal que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de los fragmentos del dominio A2 373-540, 373-508, 445-508, 484-508, 404-508, 489-508 y 484-489, con secuencias de factor VIII porcino o murino correspondientes, usándose dicho híbrido para el tratamiento de deficiencias de factor VIII.

Los anticuerpos que reconocen estos diversos sitios interfieren con la activación del FVIII, la unión de vWf, FIXa, FXa, APC o fosfolípidos. La respuesta de anticuerpos específicos frente a FVIII varía considerablemente entre individuos, y los epítopos para anticuerpos inhibidores tienen que determinarse para todos los dominios de FVIII (véanse para una revisión reciente, Scandella, 2000; Lollar, 2000).

Otros anticuerpos, que no inhiben pruebas de actividad convencional *in vitro*, pueden ejercer una influencia sobre el comportamiento de FVIII con los otros constituyentes de la cascada de coagulación mientras se unen ellos mismos a sitios en la molécula que están a una distancia sustancial de los sitios activos. Estos anticuerpos pueden interferir con el estado natural de plegamiento de FVIII alterando algunas de sus propiedades.

El surgimiento de aloanticuerpos (inhibidores) que neutralizan la actividad de FVIII infundido puede complicar gravemente la terapia de restitución de FVIII. Las tasas de incidencia de inhibidores notificadas en hemofílicos varían considerablemente. Oscilan alrededor del 6-35% (Vermylen *et al.*, 1998). Se han encontrado candidatos para predisposiciones genéticas tales como deleciones largas e inversiones del intrón 22 asociados con una alta incidencia de inhibidores y genes que están implicados en la respuesta inmunitaria como genes de MHC de clase I y clase II (Tuddenham y McVey, 1998). El intercambio repetido de un producto de FVIII por otro y la posibilidad de que algunos concentrados de FVIII sean más inmunogénicos también puede explicar la aparición de inhibidores (Vermylen *et al.*, 1998). Diferentes métodos de preparación de FVIII podrían ejercer una influencia sobre su estructura, sus propiedades fisicoquímicas o su microentorno natural; Laub *et al.* (1999); Raut *et al.* (1998)). Autoanticuerpos anti-FVIII clínicamente relevantes son poco comunes en pacientes no hemofílicos (frecuencia anual en la población: $1\text{-}5/10^6$) (Morrisson y Ludlam) (1995). Están asociados con varias enfermedades autoinmunitarias y a menudo se caracterizan por hemorragia potencialmente mortal. Por otro lado, también se han descrito anticuerpos anti-FVIII en sujetos sanos (Algiman *et al.*, 1992; Moreau *et al.*, 2000), sin ningún efecto aparente sobre los niveles de los sujetos de FVIII circulante.

Los péptidos derivados o las proteínas propias pueden provocar una respuesta inmunitaria si se les presentan a células T CD4 en sitios inflamatorios por células presentadoras de antígenos profesionales. Usando conjuntos de péptidos sintéticos solapantes que abarcan las secuencias de dominios de FVIII individuales, Reding *et al.* (2000) mostraron $CD4^+$ reactivos frente a FVIII en sujetos sanos y pacientes con hemofilia. Se reconocieron varios dominios de FVIII: el dominio A3 se reconocía más fuerte y frecuentemente y cada dominio forma varios epítopos.

Técnicas tales como inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), usando fragmentos proteolíticos de FVIII bien definidos, una gran biblioteca de péptidos recombinantes, o alineamientos de péptidos sintéticos, se han usado para mapear diferentes sitios de unión de inhibidor de FVIII ubicados principalmente en los dominios A2 y C2. Sin embargo, ninguna de estas técnicas ha

hecho posible la construcción de un modelo para la identificación de epítopos inhibidores y no inhibidores. Sólo algunos epítopos se han mapeado en secuencias diferenciadas (<20 residuos de aminoácido). Para solucionar este problema, Palmer *et al.* (1997) sintetizaron 96 péptidos undecámeros (11 residuos de aminoácido) que representaban el 80% de la secuencia de residuos completa de FVIII. Tuvieron éxito en la determinación de la especificidad de epítopo de anticuerpos inhibidores de 9 pacientes. Otras técnicas útiles son análisis de mutaciones génicas de FVIII y sus efectos en la molécula de FVIII así como la tecnología de presentación en fago (van den Brink *et al.*, 2000). Todas estas metodologías, sin embargo, requieren mucho tiempo, son bastante costosas y dependen en gran medida de la disponibilidad del paciente. Ciertas zonas de la molécula de FVIII pueden ser "puntos calientes" que contienen agrupamientos de epítopos inhibidores comúnmente reconocidos, por ejemplo, regiones en el dominio A2, el dominio A3 y el dominio C2. El motivo de estos "puntos calientes" en la generación de una respuesta inhibidora sigue entendiéndose mal (Reisner *et al.*, 1995).

Actualmente, un concepto predominante entre pacientes hemofílicos, médicos y "fraccionadores" es el de tener disponible un FVIII purificado que carezca de todos los contaminantes plasmáticos patógenos y efectos secundarios.

Podrían usarse diferentes modelos animales como perros con hemofilia, ratones scid, ratones con hemofilia... pero hasta ahora, no existe ningún modelo experimental satisfactorio que haga posible predecir la inmunogenicidad o el efecto inmunomodulador de las preparaciones de FVIII, o la susceptibilidad del huésped, antes de que se hayan administrado clínicamente.

Los pacientes que desarrollan una respuesta inmunitaria anti-FVIII se encuentran por sí mismos en una situación grave que necesita el uso de medidas serias, agresivas y excesivamente caras.

Uno de los tratamientos frecuentes es la inducción de tolerancia inmunitaria mediante la administración de dosis muy altas de FVIII (150 UI/kg dos veces al día) en asociación o no con concentrados de complejo de protrombina y se denomina "protocolo de Bonn". Las opciones de tratamiento también son desviar la actividad inhibidora de FVIII mediante el uso de PCC (preferiblemente un PCC activado [APCC]) o FVIIa. Podrían producirse anticuerpos específicos como consecuencia de la infusión de estos agentes alternativos, alterando el tratamiento. Como agente alternativo, puede usarse FVIII porcino para lograr la hemostasia en pacientes con anticuerpos que no reaccionan de manera cruzada sustancialmente con FVIII porcino antes o durante el tratamiento (Lollar, 2000).

Un posible enfoque alternativo para inhibir la producción de inhibidores es el bloqueo de la colaboración de células T/células B mediada a través de acontecimientos de señal de unión ligando-receptor (Ewenstein *et al.*, 2000). Se realizaron ensayos clínicos preliminares usando un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado frente a un ligando de célula T CD40 humana (CD 154).

Una estrategia fructífera para reducir el nivel de inhibidores ha consistido en someter a los pacientes a una circulación extracorpórea que permita la absorción en fase sólida de las IgG totales.

El inmunoabsorbente podría ser proteína A de estafilococos unida a Sepharose o anticuerpos de oveja policlonales unidos a Sepharose frente a inmunoglobulina humana total (Knobf y Derfler, 1999). Las proteínas foráneas (proteína A, anti-Ig humana de oveja) podrían escaparse de la columna y activar el sistema inmunitario del receptor; además podrían surgir problemas como la higienización (ICH Topic Q5A, Directiva 92/79/EC).

Se ha encontrado que la infusión de inmunoglobulinas intravenosas polivalentes (IVIG), cuando sea apropiado combinadas con un tratamiento inmunosupresor, es relativamente eficaz, aunque el motivo de esta eficacia aún no se ha establecido completamente. Se han avanzado diversas hipótesis que implican a la inhibición de la retroalimentación de la síntesis de IgG, la estimulación del aclaramiento de IgG o la activación de células T supresoras. Una explicación interesante es que estas inmunoglobulinas intravenosas comerciales podrían contener anticuerpos que pueden reaccionar con las partes variables (idiotipos) de los anticuerpos anti-FVIII y neutralizar estos anticuerpos (Dietrich *et al.* (1992)).

Desafortunadamente, no se ha encontrado que ninguno de estos enfoques sea satisfactorio en cuanto a seguridad, eficacia y coste.

El estado de la técnica en la predicción de la estructura del epítopo era limitado debido al hecho de que residuos de aminoácido no continuos parecen constituir el epítopo más importante y que la dinámica de unión no se integra a menudo en la ecuación de predicción del epítopo, lo que hace que la predicción de la estructura del epítopo sea un problema cuatridimensional complejo (Van Regenmortel, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 9, páginas 465-472, 1996).

Según el autor, la mayoría de los anticuerpos producidos contra proteínas intactas no reaccionan con ningún fragmento de péptido derivado de la proteína original, lo que indica que tales anticuerpos se dirigen a epítopos discontinuos (epítopos conformacionales).

Este autor también establece que la baja tasa de éxito de la predicción antigénica se debe al hecho de que las predicciones se refieren sólo a epítopos continuos y no es realista reducir la complejidad de los epítopos que

siempre poseen características conformacionales frente a un modelo de péptido lineal unidimensional.

De manera similar, Palmer *et al*. (1997), usando alineamientos de péptidos sintéticos para identificar epítopos inhibidores del factor VIII novedosos, observaron que cada patrón de pacientes de reactividad de anticuerpos anti-factor VIII parece ser policlonal, dirigido contra sitios múltiples ubicados dentro de los extremos amino terminal y carboxilo terminal de la proteína y parecen ser únicos para cada plasma investigado (véase también anteriormente). Además, este autor observa que es difícil predecir la importancia que cualquier interacción anticuerpo:epítopo dada pueda tener sobre la actividad de coagulación del factor VIII basándose en los resultados de ensayos de péptidos sintéticos solos (debido al entendimiento incompleto de la relación entre la estructura y función de diferentes dominios del factor VIII y la posibilidad de que anticuerpos tanto inhibidores como no inhibidores puedan estar presentes en el plasma de un paciente).

La solicitud PCT WO 96/02572 ya dio a conocer algunas secuencias de polipéptidos antigénicos interesantes del factor VIII y epítopos y o inhibidores del mismo para su uso en el tratamiento de hemofilia.

La publicación de Nogami *et al.*, 1999, (JBC vol. 274, n.º 43, 22 de octubre de 1999, págs. 31000-31007) da a conocer el papel del dominio C2 del factor VIII para unirse al factor Xa y en particular da a conocer dos péptidos sintéticos correspondientes a los residuos 2248-2285 y 2253-2270 del factor VIII, que pueden inhibir la unión del péptido del dominio C2.

Por tanto, los documentos del estado de la técnica no sugieren identificar péptidos lineales antigénicos sobre una macromolécula (tal como el factor VIII) y que podrían usarse epítopos lineales para el diagnóstico y/o la terapia de trastornos inmunitarios inducidos por inhibidores dirigidos contra el factor VIII.

La solicitud de patente internacional WO96/0257 describe secuencias de epítopo y fragmentos antigénicos del factor VIII e inhibidores dirigidos contra algunas de estas secuencias.

**Objetivos de la invención**

La presente invención va dirigida a obtener nuevos epítopos antigénicos del factor VIII con el fin de mejorar el diagnóstico y/o la terapia (incluyendo la prevención) de trastornos inmunitarios (en particular los inducidos por inhibidores de FVIII, especialmente inhibidores de la unión de FVIII al factor de von Willebrand (vWf), al FIX y/o a fosfolípidos de membrana (PL)), permitiendo dichos epítopos una selección entre auto o aloanticuerpos anti-FVIII inhibidores o no inhibidores (alo o autoinmunoglobulinas).

Otro objetivo de la invención es obtener inhibidores que muestran una inmunoafinidad con estos epítopos antigénicos, así como obtener anti-inhibidores, en particular anticuerpos o receptores de células (T), que se dirigen contra dichos inhibidores mencionados anteriormente y cuyo fin es mejorar el diagnóstico y/o la terapia (o prevención) de trastornos inmunitarios.

Un objetivo adicional de la invención es obtener dichas moléculas a alta pureza, a nivel industrial, sin contaminantes (virus, priones,...) y según las prácticas de GMP en el campo de la terapia y el diagnóstico (ICH topic QSA, Directiva 92/79/EC, etc.).

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a las secuencias de polipéptidos antigénicos (epítopos) del factor VIII cuya secuencia completa se describe por Verhar *et al.* (1984) y que proporcionan la referencia para la numeración de aminoácidos de la secuencia del factor VIII completa.

La “secuencia de polipéptidos completa del factor VIII” se entiende que es la secuencia animal o humana natural, que puede estar glicosilada y que se ha obtenido mediante purificación a partir de conjuntos de plasma, en particular crioprecipitado, mediante síntesis y/o mediante manipulación genética (secuencia de la que pueden haberse delecionado partes que no están implicadas en el mecanismo de coagulación sanguínea) del factor VIII.

La presente invención proporciona una secuencia de epítopo antigénico del factor VIII que está comprendida entre isoleucina 2262 y glutamina 2270 inclusive, definida por la siguiente secuencia:

**SEQ ID No:30:**

**Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln**

**1 5**

La invención también se refiere a las partes principales de dichos epítopos. Dichos epítopos pueden tener una deleción de uno o más aminoácidos terminales, preferiblemente de uno, dos o tres aminoácidos, o pueden reemplazarse por uno o más aminoácidos que presentan la misma característica de hidrofilicidad, flexibilidad y accesibilidad.

También se sabe que algunos de los epítopos según la invención están comprendidos en determinantes importantes de epítopos inhibidores humanos o varios sitios de unión de factores o sitios de unión de anticuerpos monoclonales conocidos, especialmente la parte C2 que se sabe que es el sitio de unión del anticuerpo monoclonal Mas531P o el sitio de unión ESH8 así como fosfolípidos, factor Xa o el sitio de unión del factor de von Willebrand. Sin embargo, los epítopos específicos o sus partes importantes son partes preferidas seleccionadas de dichos sitios de unión o pueden incluir un posible solapamiento con dichos sitios de unión.

Estas secuencias de epítopos se caracterizan de manera particularmente ventajosa por su alta hidrofilicidad, que se ha definido por Parker y Hodges (1986), flexibilidad considerable, que se ha definido por Karplus y Schultz (1985) y accesibilidad considerable, que se ha definido por Janin (1979).

Estos epítopos están, en particular, expuestos en la superficie de la proteína del factor VIII y muestran características inmunogénicas y antigénicas pronunciadas.

Otro aspecto de la presente invención es un FVIII recombinante, posiblemente obtenido mediante ingeniería genética, y con deleción de uno o más de los epítopos identificados anteriormente o partes importantes de dichos epítopos.

Ventajosamente, dicho FVIII permite todavía la unión de factor(es) de coagulación, pero será menos inmunogénico y no inducirá o inducirá menos la formación de inhibidores dirigidos contra dicho FVIII modificado o FVIII natural.

Ventajosamente, dichos epítopos también son independientemente inmunogénicos (es decir, son inmunogénicos incluso sin estar complejados con una proteína de gran tamaño tal como BSA, KLH, hemocianina, etc.), y preferiblemente muestran una inmunoafinidad dentro de inhibidores del factor VIII, tales como anticuerpos anti-factor VIII, y/o muestran una inmunoafinidad por los receptores de los linfocitos T y posiblemente linfocitos B.

Estos epítopos y/o partes importantes de dichos epítopos inducen una reacción inmunitaria (síntesis de anticuerpos) cuando se inyectan en un conejo.

Dichas secuencias se caracterizan inesperadamente por su inmunogenicidad sustancial hacia anticuerpos monoclonales y policlonales, pero son lo suficientemente cortos como para obtenerse fácil y ventajosamente mediante síntesis.

La presente invención también proporciona los epítopos conformacionales que comprenden al menos dos secuencias de epítopos diferentes y/o al menos dos partes importantes de dichos epítopos según la invención e identificados anteriormente.

Los epítopos conformacionales están constituidos por dos o más partes diferentes de una secuencia de polipéptido, cuyas partes están ubicadas en proximidad entre sí cuando la proteína se pliega en su estructura terciaria o cuaternaria.

Estos epítopos pueden “reconocerse” (es decir, que muestran una inmunoafinidad), preferiblemente de manera simultánea, con inhibidores del factor VIII, en particular linfocitos B y T (por medio del locus de histocompatibilidad principal (MHC I y/o II)) y/o anticuerpos anti-factor VIII (Scandella *et al.* (2000); Reding *et al.* (2000)).

Preferiblemente, dichos epítopos y/o las partes importantes de dichos epítopos están complejadas con una proteína portadora o un péptido portador, tal como BSA, o KLH hemocianina, de modo que forman un complejo que muestra una inmunogenicidad más potente.

La presente invención también proporciona un conjunto de epítopos antigénicos del factor VIII, tal como se definen en la reivindicación 2.

Otro aspecto de la presente invención es un inhibidor del factor VIII que muestra una inmunoafinidad con el epítopo antigénico y posiblemente también con el conjunto de epítopos, o con el epítopo conformacional según la invención.

Se entiende que un inhibidor significa cualquier molécula biológica o célula (tal como un linfocito T) que se une a dicho FVIII y puede dar lugar a trastornos inmunitarios (caracterizados por respuesta inmunitaria humoral y/o respuesta inmunitaria celular contra dicho FVIII).

En particular, un inhibidor de este tipo puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoclonal o policlonal anti-factor VIII (tal como la parte Fab hipervariable de dicho anticuerpo) que inactiva dicho factor VIII y/o que inhibe la unión del factor VIII al factor de von Willebrand y/o a fosfolípidos de membrana.

Ventajosamente, dichos inhibidores se sintetizan mediante un animal “quimérico” que comprende un sistema inmunitario humano, tal como un ratón hu-SCID o ratón transgénico que produce anticuerpos humanos u otras tecnologías de producción de anticuerpos como tecnología de presentación en fago o células B inmortalizadas, mediante EPV en particular.

Otro aspecto de la invención es un anti-inhibidor que se dirige contra dicho inhibidor del factor VIII descrito anteriormente.

Se entiende que un anti-inhibidor que se dirige contra el inhibidor del factor VIII significa cualquier molécula biológica o química, una célula y/o un fragmento de célula (receptor) que puede interferir con dicho inhibidor de tal manera que garantiza su inactivación o evita o reduce su unión al factor VIII.

Preferiblemente, un anti-inhibidor de este tipo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-idiotipo-anti-factor VIII (monoclonal o policlonal), natural u obtenido mediante ingeniería genética.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica tal como se define en las reivindicaciones.

El tipo y la cantidad de diluyente o portador farmacéutico adecuado (y posiblemente adyuvante o excipiente) presente en dicha composición farmacéutica puede variar según el método de administración y se combina posiblemente un adyuvante con el fin de mejorar las propiedades terapéuticas de la composición farmacéutica según la invención o reducir sus posibles efectos secundarios. El experto en la técnica conoce bien portadores farmacéuticamente aceptables adecuados usados en la composición farmacéutica según la invención y se seleccionan según los métodos generalmente aplicados por farmacéuticos y pueden incluir portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos sólidos, líquidos o gaseosos. El porcentaje de producto activo/portador farmacéuticamente aceptable puede variar dentro de intervalos muy amplios sólo limitados por la tolerancia y los posibles efectos secundarios sobre pacientes (incluyendo seres humanos), y por la frecuencia y/o el modo de administración.

Otro aspecto de la invención es un dispositivo de purificación y/o de diagnóstico, tal como un kit de diagnóstico, un filtro de afinidad o una columna de cromatografía, tal como se define en las reivindicaciones. Ventajosamente, dicho dispositivo comprende el conjunto de dichos epítopos que permite una selección de pacientes y puede detectar los inhibidores más importantes presentes en dichos pacientes y que permiten una prueba positiva con sensibilidad y especificidad suficiente.

El dispositivo de purificación puede consistir por tanto en una columna de cromatografía que comprende estos epítopos y/o partes importantes de epítopos, unidos a la fase sólida de la columna de cromatografía.

Un líquido fisiológico (tal como suero), que se deriva de un paciente y que comprende inhibidores del factor VIII pasa a través de un soporte sólido (columna de cromatografía), uniéndose dichos inhibidores (por ejemplo anticuerpos) específicamente a dichos epítopos o dichas partes importantes o un conjunto de los mismos. Tras la elución, es posible recoger dichos inhibidores haciendo que reaccionen con anti-inhibidores (anticuerpos anti-idiotipo-anti-factor VIII).

También es posible caracterizar anticuerpos anti-idiotipo-anti-factor VIII que están presentes en un suero mediante estos anti-inhibidores hechos pasar a través de un soporte sólido (columna de cromatografía) sobre el que se han unido inhibidores del factor VIII a la fase sólida.

También es posible reinyectar ’(tratamiento *ex vivo*) el líquido fisiológico (sangre o suero o una fracción derivada) a dicho paciente tras haberse eliminado sus inhibidores del factor VIII uniéndolos con dichos epítopos o un conjunto de los mismos; eliminándose dichos inhibidores del fluido fisiológico (sangre o suero) de manera similar tal como se propuso para el método de diálisis aplicado a pacientes humanos.

La presente invención también se refiere a un método de tratamiento *in vitro* (tratamiento *ex vivo*) de líquido fisiológico (sangre o suero) de un paciente, tal como se define en las reivindicaciones. Dicho líquido fisiológico tratado puede reinyectarse en el paciente tras eliminar los inhibidores que han fijado dichos epítopos, partes importantes o un conjunto de los mismos.

Un aspecto final de la invención es el uso de la composición farmacéutica según la invención para preparar un medicamento usado para prevenir y/o tratar la hemofilia inducida por los inhibidores del factor VIII, inhibidores de la unión del factor VIII al factor IX y/o el factor X y/o el factor de von Willebrand (vWF) y/o inhibidores de la unión del factor VIII a fosfolípidos de membrana.

La presente invención describirá en detalle en los siguientes ejemplos no limitativos en referencia a las figuras adjuntas.

**Breve descripción de las figuras**

La figura 1 representa el gráfico de hidrofilicidad, flexibilidad y accesibilidad de la secuencia A3 de los aminoácidos 1 a 371 reenumerados del factor VIII (valor de superficie para cada aminoácido).

La figura 2a representa el perfil de elución relacionado con la purificación de anticuerpos anti-SEQ ID 32 humanos mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de péptido-Sepharose. Se cargó la disolución de fracción de Cohn II+III (50 ml) sobre la columna (1 ml de gel) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se realizó la separación de

anticuerpos específicos tal como se describe a continuación en el presente documento. La flecha indica la posición de anticuerpos anti-SEQ ID 32 humanos específicos.

La figura 2b representa la actividad coagulante de FVIII en presencia de IgG anti-(SEQ ID 32) purificado a partir de la fracción de Cohn II+III. Se midió la actividad coagulante de FVIII tal como se describe a continuación en el presente documento en presencia de una cantidad creciente de anti-SEQ ID 32. El % de actividad de FVIII = (actividad de FVIII en presencia de anticuerpo/actividad de FVIII en ausencia de anticuerpo)*100.

La figura 3 representa las inmunorreacciones del anticuerpo anti-péptido humano con polipéptidos de FVIII tras la inmunotransferencia de tipo Western (panel A de izquierda a derecha: anticuerpos humanos HAP1 a HAP4, específicos para diferentes secuencias de epítopos de FVIII halladas en el FVIII HC (véase también la tabla 2) y panel B: anticuerpos humanos específicos para el péptido P5 y las secuencias de FVIII LC, P7, P8 y P9 (véase también la tabla 2)). El carril RAP9 muestra la reactividad de los polipéptidos de FVIII hacia anticuerpos de conejo purificados específicos para la secuencia del péptido $Arg^{1797}$-$Tyr^{1815}$ (véase también la tabla 2).

La figura 4 representa la reactividad de ELISA de 4 plasmas inhibidores con diferentes secuencias de péptido. Se analizaron inhibidores presentes en plasmas de 4 pacientes mediante una prueba de ELISA usando como antígenos de recubrimiento los diferentes péptidos sintéticos de epítopos de FVIII seleccionados tal como se indica en la ordenada.

**Ejemplos**

**Materiales y métodos**

**Reactivos**

MAS530p (Harlan-Seralab, Indianapolis, IN) es un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el dominio A2 de 44 kDa de la cadena pesada del factor VIII. Se adquirió IgG de conejo anti-IgG de ratón marcada con biotina de Dakopatts (Copenhague, Dinamarca). Se obtuvieron IgG de cabra anti-IgG humana marcada con biotina e IgG de ratón anti-IgG de conejo marcada con biotina de Sigma Chemicals (St Louis, MI), $\alpha$-trombina purificada (3000 UI/mg), se adquirieron conjugado de estreptavidina-peroxidasa, ovoalbúmina (OVA), albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH) y o-fenilendiamina (OPD) de Sigma Chemicals (St. Louis, MI). Se obtuvo caseína de Merck (Darmstadt, Alemania). Se obtuvieron 4-cloro-1-naftol y marcadores de peso molecular biotinilados de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). El adyuvante de Freund era de Difco (Detroit, Michigan).

**Concentrados de FVIII**

FVIII plasmático (p-FVIII) era un concentrado de FVIII tratado con detergente/disolvente (100 UI/mg de proteína) purificado mediante cromatografía de intercambio iónico (FVIII Conc. SD, CAF-DCF-Red Cross, Bruselas, Bélgica). Se obtuvo FVIII recombinante libre de albúmina (rFVIII) de Hyland (Glendale, CA).

**Inmunoglobulinas de la fracción plasmática**

Se obtuvo la fracción de Cohn II+III de un gran conjunto de plasma de 4.800 donantes no remunerados, tras la precipitación en presencia de una concentración de etanol creciente. Esta fracción contiene todas las clases y subclases de Ig. Se determinó la composición de IgG mediante nefelometría. El porcentaje relativo de cada subclase era de 63,7; 30,1; 3,4 y 2,8 para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente (valores promedio para 3 lotes diferentes de FII+III).

**Concentrados del factor VIII, actividad del factor VIII e inhibición de la actividad**

Se determinó la actividad del factor VIII en un ensayo de coagulación de una fase adaptado para su uso en el coagulómetro KC4A (Sigma Diagnostics). El ensayo usa plasma de hemofilia A grave (Organon Teknika, Cambridge, RU) y reactivo APPT de Instrumentation Laboratory (Warrington, RU). Se calcularon las potencias con relación al concentrado de FVIII 88/640 de 5º patrón internacional (5,4 UI/ml) (NIBSC, Potters Bar, RU). Se midió la actividad inhibidora de FVIII en preparaciones de IgG humana y de conejo purificadas según el ensayo de Bethesda modificado. En resumen, se diluyeron en serie IgG purificadas por afinidad y se incubaron durante 1 h en presencia de concentrado de FVIII 88/640 (1 UI/ml) a 37ºC. Se midió la actividad de FVIII residual tal como se describió anteriormente.

Se ha descrito la activación del factor VIII mediante $\alpha$-trombina e inmunotransferencia en otra parte (Peerlinck *et al.*, 1997).

Se realizaron la síntesis de péptidos, la conjugación de péptidos a proteínas portadoras y la producción de antisueros anti-péptido de conejo por Neosystem (Estrasburgo, Francia).

**Purificación de anticuerpos humanos y de conejo mediante cromatografía de afinidad**

Para la purificación de anticuerpos humanos y de conejo, se acoplaron 5 mg de cada péptido diferente a 1 ml de Sepharose activada por NHS empaquetada previamente (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Se purificaron anticuerpos anti-péptido específicos con un sistema de cromatografía de líquidos automatizado (ÄKTAexplorer 100A, Pharmacia Uppsala, Suecia) o bien a partir de 50 ml de antisuero de conejo o bien a partir de 100 ml de una fracción de plasma humano, obtenido tras el fraccionamiento de Cohn (fracción II+III; 13 mg de proteína/ml). En resumen, se dializaron las muestras 3 veces frente a 5 volúmenes de tampón TE (Tris-HCl 20 mM pH 7,2, NaCl 150 mM y $NaN_3$ al 0,02%) y se cargaron sobre la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se lavó secuencialmente la columna a 2 ml/min. con 50 ml de tampón TE y 30 ml de TE que contenía NaCl 1 M. Tras la absorción, se eluyó el material (1 ml/min.) con 5 ml de ácido cítrico 0,1 M pH 2,5 y se recuperó directamente en 5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Finalmente se dializaron las muestras frente a 10 volúmenes de tampón de equilibrio y se concentraron en Centriprep-30 (Amicon, Beverly, MA). Se determinó la recuperación de Ig mediante el ensayo de proteínas de Bio-Rad.

**Resultados**

**Selección de posibles epítopos lineales del factor VIII**

Se identificaron más de 30 regiones de superficie (epítopos lineales) que abarcan de 8 a 25 residuos, caracterizados por una alta hidrofilicidad, flexibilidad y accesibilidad en la molécula del FVIII. Basándose en su alta probabilidad de una ubicación externa (véase la fig. 1 para A3), se seleccionaron 16 péptidos lineales (P1 a P16), que coinciden en tramos identificados de 13 o más residuos de aminoácido. Se sintetizaron estos péptidos y se acoplaron a ovoalbúmina para la producción de antisuero específico (tabla 1, a continuación en el presente documento). P8 incluye el epítopo descrito por Shima *et al.* (1988) y se usó como control externo.

**Resultados experimentales obtenidos a partir de dichos epítopos lineales sintetizados usando el modelo de conejo**

Se resumen los resultados en la tabla 1 que se refiere a la caracterización de antisueros anti-péptido de FVIII de conejo y de inmunoglobulinas purificadas por afinidad recuperadas.

Se seleccionaron dieciséis péptidos sintéticos (de desde 10 hasta 20 aminoácidos) en los dominios A, B, C1 y C2. Tras la conjugación con ovoalbúmina, se inyectaron los conjugados de OVA-péptido en conejos y se estudiaron los antisueros anti-péptido de FVIII RAP1 a RAP16.

Más precisamente, se inmunizaron dos conejos con cada preparación de péptido de FVIII-ovoalbúmina. Se prepararon los antisueros específicos RAP1 a RAP16 (columna b, tabla 1) y se sometieron a ensayo en un ELISA (columna c, tabla 1) usando rFVIII o péptido de FVIII-KLH como antígeno. Se expresa el título de ELISA como el logaritmo negativo de la inversa de la dilución de suero que proporciona el 50% de unión. Entonces se purificaron las inmunoglobulinas mediante cromatografía sobre Sepharose unida a péptido. El dominio de FVIII reconocido por la Ig anti-péptido de FVIII tras la inmunotransferencia se muestra en (columna d, tabla 1) y se midieron las recuperaciones de proteína Ig (columna e, tabla 1) usando inmunoglobulinas como patrón. La actividad inhibidora, expresada en BU/mg de proteína, se determinó en un ensayo de actividad neutralizante de FVIII (columna f, tabla 1).

**Inmunogenicidad de péptidos de FVIII y caracterización de antisueros anti-péptido de FVIII de conejo**

Se midió la reactividad de antisueros anti-péptido de FVIII mediante un ELISA usando, como antígeno, o bien el péptido de FVIII correspondiente diferente acoplado a la proteína KLH o bien rFVIII purificado. La reacción de unión de cada antisuero anti-péptido de FVIII era específica tanto para el péptido de FVIII usado para producir la respuesta inmunitaria en conejos como para rFVIII (véase la tabla 1).

Para demostrar la especificidad de epítopo de FVIII de los anticuerpos anti-péptido de conejo, se resolvieron rFVIII y los fragmentos de rFVIII obtenidos tras el tratamiento con trombina mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con las diferentes preparaciones de IgG de conejo. Tal como se esperaba, la mayoría de los antisueros (14/16, 87%), mostraron una fuerte reacción con el fragmento de FVIII correspondiente que contenía el epítopo lineal seleccionado (véase la tabla 1).

**Purificación de anticuerpos anti-péptido de FVIII de conejo**

Se purificó la IgG de conejo específica mediante cromatografía de afinidad sobre péptido-Sepharose tal como se describió en los métodos. Cuando se midió la actividad neutralizante de FVIII en un ensayo de coagulación de una fase, se encontró una inhibición significativa con dos preparaciones purificadas de IgG de conejo: RAP2, que corresponde a la IgG específico para SEQ ID No. 14 y RAP7 específica para SEQ ID No: 01.

**Mapeo de epítopos de anticuerpos anti-péptido de FVIII de conejo mediante inmunotransferencia con rFVIII humano**

Para demostrar la especificidad de epítopo de FVIII de los anticuerpos anti-péptido de conejo, se resolvieron rFVIII y los fragmentos rFVIII obtenidos tras el tratamiento con trombina mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante

inmunotransferencia de tipo Western con diferentes preparaciones de IgG de conejo (Ig de RAP1 a RAP17).

En cada tanda, se identificaron la cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) de rFVIII y sus productos de proteólisis con trombina (44 kDa y 72 kDa) con una mezcla de dos anticuerpos monoclonales, MoAb 530p y MoAb18, respectivamente específicos para la cadena pesada y ligera. MoAb18 reconoce el fragmento de FVIII de cadena ligera $NH_2$-terminal obtenido tras la activación con trombina, que se probó que era muy pequeño para permanecer en el gel tras la electroforesis. Catorce de las 17 preparaciones de inmunoglobulina de conejo reaccionaron fuertemente tanto con rFVIII como con pFVIII. Los antisueros RAP1, RAP2, RAP3, RAP4 reconocieron exclusivamente las cadenas pesadas (de 200 kDa a 92 kDa). Los antisueros RAP1 y RAP2 reaccionaron con el fragmento del dominio A1 de 50 kDa; RAP3 y RAP4 se unieron al fragmento de 44 kDa (dominio A2); RAP5 (específico para el dominio B) se unió a la cadena pesada de FVIII de alto peso molecular (aproximadamente 200 kDa).

RAP7, RAP8 y RAP9 reaccionaron con el doblete de cadena ligera de 80 kDa. Los anticuerpos RAP9 y RAP12 a RAP17 también detectaron el fragmento de cadena ligera de FVIII de 72 kDa. Tal como se esperaba, cada antisuero reactivo mostró una fuerte reacción con el fragmento de FVIII correspondiente que contiene el epítopo lineal seleccionado. No pudo detectarse ninguna reacción en los geles entre RAP6 o RAP10 y los fragmentos de FVIII de HC o LC .

**Resultados experimentales obtenidos a partir de dichos epítopos lineales sintetizados para purificar y caracterizar autoanticuerpos humanos**

La tabla 2 se refiere a la caracterización de anticuerpos anti-FVIII humanos de la fracción de Cohn II+III de individuos sanos.

Se purificaron hasta este punto preparaciones de IgG anti-péptido humana (HAP1 a HAP17) sobre Sepharose acoplada a 13 péptidos de FVIII diferentes (columna a, tabla 2). Se analizaron las Ig (columna b, tabla 2) mediante inmunotransferencia. Se muestra la unión a las cadenas HC o LC de rFVIII y al fragmento de trombina de rFVIII respectivamente en las columnas c y d, tabla 2. Se muestra la reactividad de dominio de FVIII en la columna e, tabla 2. Las flechas indican una disminución en la intensidad de la banda de 80 kDa. La recuperación de la Ig (columna f, tabla 2) tras la purificación por afinidad se expresa en μg/10 mg de FII+III cargado (véase Materiales y métodos). Se determinó la inhibición del ensayo de coagulación tras la incubación en presencia de cada una de las 13 preparaciones de Ig en el ensayo de Bethesda (columna g, tabla 2).

**Uso de péptidos de FVIII para la inmunopurificación de anticuerpos anti-FVIII humanos en donantes sanos**

Para preparar y caracterizar anticuerpos anti-FVIII humanos presentes en individuos sanos, se analizó la fracción de Cohn II+III, rica en inmunoglobulinas, para determinar la presencia de anticuerpos anti-péptido específicos seleccionados. Se purificaron anticuerpos anti-péptido de FVIII humanos (HAP1 a HAP11, HAP16 y HAP17) mediante cromatografía de afinidad sobre Sepharose acoplada al péptido apropiado (véase la tabla 2). Como ejemplo típico, la figura 2 muestra el perfil cromatográfico obtenido con SEQ ID 32, una secuencia encontrada en el dominio C2. La tabla 2 resume los resultados obtenidos con 17 secuencias epitópicas seleccionadas en cada dominio de FVIII (A1, A2, A3, B, C1 y C2). Se obtuvieron cantidades significativas de inmunoglobulinas, específicas para cada uno de los 13 péptidos de FVIII usados, a partir de la fracción de plasma de partida II+III. Se sometió a prueba directamente la especificidad de los anticuerpos humanos purificados resultantes mediante inmunotransferencia con FVIII plasmático, FVIII recombinante, y los fragmentos obtenidos tras la proteólisis con trombina (véase la tabla 2).

Se encontró que la distribución de isotipo de IgG en las preparaciones de anticuerpos purificados humanos era bastante heterogénea. De manera interesante, del 40 al 79% de las IgG recuperadas pertenecían a la subclase IgG2. En la mayoría de las preparaciones, IgG4 parecía estar sobrerrepresentada (hasta el 25%).

Se sometieron a prueba todas las preparaciones anticuerpos anti-péptido de FVIII humanos para determinar la capacidad de inhibir la actividad de FVIII en un ensayo de coagulación de una fase. La tabla 2 muestra que siete de las 13 preparaciones sometidas a prueba (54%) mostraban actividad inhibidora, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 19, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 22, SEQ ID No: 32 y SEQ ID No: 33, respectivamente. Como ejemplo típico, la inhibición de la actividad de FVIII en función de la concentración de Ig anti-SEQ ID 32 se muestra en la figura 2.

**Inmunoespecificidad de Ig anti-péptido de FVIII humana hacia FVIII**

Se sometió a prueba la especificidad de los anticuerpos humanos purificados resultantes mediante inmunotransferencia con FVIII plasmático, FVIII recombinante y los fragmentos obtenidos tras la proteólisis con trombina. De nuevo, se identificaron los fragmentos de FVIII con o bien anticuerpos monoclonales de ratón específicos de LC de FVIII o HC de FVIII o bien anticuerpos policlonales de conejo específicos de péptido de FVIII. Se identificaron los anticuerpos humanos tras la unión de anticuerpo anti-IgG humana de cabra biotinilado. La figura 3 muestra la inmunorreacción de FVIII de alto peso molecular (≥ 92 kDa) con cuatro preparaciones de anticuerpos

humanos, purificados sobre Sepharose acoplada a SEQ ID No: 11 ($Ser^{109}$-$Lys^{127}$), SEQ ID No: 14 ($Cys^{329}$-$Asp^{348}$), SEQ ID No: 15 ($Tyr^{407}$-$Lys^{425}$) o SEQ ID No: 19 ($Cys^{711}$-$Asp^{725}$) de péptido de FVIII. Se reconoció el fragmento de FVIII de 50 kDa (dominio A1) por anticuerpos humanos purificados sobre $Ser^{109}$-$Lys^{127}$ o $Cys^{329}$-$Asp^{348}$-Sepharose y el fragmento de FVIII de 44 kDa (A2) por inmunoglobulinas purificadas sobre $Tyr^{407}$-$Lys^{425}$ y $Cys^{711}$-$Asp^{725}$-Sepharose. La falta de reactividad de la preparación de inmunoglobulinas anti-($Ser^{817}$-$Ser^{830}$) (HAP5) con los fragmentos de FVIII confirma que este epítopo está ubicado en el extremo amino-terminal del dominio B (figura 3). Los anticuerpos humanos purificados sobre Sepharose acoplada a SEQ ID No: 1 ($Arg^{1652}$-$Tyr^{1664}$) o SEQ ID No: 2 ($Asp^{1681}$-$Arg^{1696}$) del péptido reaccionaron fuertemente con la cadena ligera de FVIII de 80 kDa (figura 3). Para ambas preparaciones, la reacción con la banda de 80 kDa desapareció tras la proteólisis con trombina, indicando que los epítopos, tal como se esperaba, están ubicados en el péptido ácido a3 en la parte $NH_2$-terminal del dominio A3 de FVIII. Cuando se analizaron anticuerpos humanos específicos para SEQ ID No: 5 ($Arg^{1797}$-$Tyr^{1815}$ en el dominio A3) del péptido mediante inmunotransferencia, su especificidad para rFVIII parecía limitada a la cadena ligera de FVIII de 80 kDa y su fragmento de trombina de 72 kDa.

No se detectó ninguna inmunorreacción con los fragmentos o cadenas de rFVIII con preparaciones de anticuerpos específicos para SEQ C y SEQ ID No: 23 de los péptidos de FVIII, aunque se obtuvo una reacción positiva en el ELISA usando rFVIII. Esto podría significar que estas preparaciones de inmunoglobulinas reconocen un epítopo conformacional.

**Uso de péptidos sintéticos de FVIII para caracterizar anticuerpos anti-FVIII humanos en plasmas de pacientes con hemofilia A**

Se usaron los péptidos seleccionados en el experimento de ELISA para determinar la especificidad de anticuerpos anti-FVIII presentes en plasmas de hemofilia A. Se recubrieron los péptidos sobre microplacas (25 μg/ml en tampón PBS durante 16 h a 4ºC). Se hizo reaccionar una disolución de 1/10 a 1/1000 de plasma del paciente en tampón Tris-caseína con el péptido recubierto durante 2 h a 37ºC. Se midió la IgG humana unida tal como se describió en Métodos. Las muestras de control eran conjuntos de plasma de donantes sanos. La figura 4 muestra los resultados obtenidos con el plasma de 4 pacientes con hemofilia A. Las densidades ópticas son valores promedio corregidos (DO de paciente-DO de conjunto de plasmas normales) de dos experimentos independientes.

**Predicción de epítopos de modelo molecular**

Pemberton *et al.* (1997) han construido un modelo molecular de los dominios A de FVIII. Este modelo tridimensional hace posible explorar las predicciones para regiones importantes de la actividad de FVIII. Se usó el modelo para ubicar los epítopos de péptidos de FVIII identificados mediante los algoritmos Parker y Hodge. Tal como predicen estos algoritmos, todos los péptidos ubicados en los dominios A se encontraron en la superficie de FVIII y eran totalmente accesibles para anticuerpos específicos.

El solapamiento entre el epítopo y el bucle de unión a FIXa (5 residuos comunes que abarcan $Glu^{1811}$-$Tyr^{1815}$) puede explicar la acción inhibidora de los anticuerpos anti-($Arg^{1797}$-$Tyr^{1815}$) correspondientes sobre la formación del coágulo de fribina.

**Análisis de los resultados**

En las pruebas de coagulación, se registró una inhibición significativa de la actividad de FVIII en presencia de anticuerpos anti-($Cys^{329}$-$Asp^{348}$) y anti-($Arg^{1653}$-$Tyr^{1664}$) de conejo, pero se observaron diferentes patrones de inhibición. La inhibición por anti-($Arg^{1653}$-$Tyr^{1664}$) sigue la cinética de segundo orden con una reducción drástica en la actividad de FVIII. Ig anti-($Cys^{329}$-$Asp^{348}$) es menos eficaz y muestra un tipo de reacción más complejo, con una dependencia no lineal de la concentración de anticuerpo. El epítopo $Arg^{1652}$-$Tyr^{1664}$ y el sitio de unión principal adyacente vWF (residuos $Glu^{1675}$-$Glu^{1684}$) están ubicados en el péptido de cadena ligera ácido a3. Tal como se muestra mediante inmunotransferencia de tipo Western, a3 se libera del dominio A3 tras el tratamiento con trombina, impidiendo la unión adicional de Ig anti-($Arg^{1652}$-$Tyr^{1664}$) a FVIII activado. Se han notificado resultados similares por Shima *et al.* (1991), que describen la secuencia de FVIII $Asp^{1663}$-$Ser^{1669}$ como un sitio de unión de anticuerpos policlonales de conejo que neutralizan la actividad de FVIII. El epítopo $Cys^{329}$-$Asp^{348}$ se solapaba con la secuencia $Asp^{348}$-$Lys^{362}$ ácida (en a1) descrita como adyacente a la proteína C activada ($Arg^{336}$) y sitios de escisión de trombina ($Arg^{372}$). Es la diana de inhibidores hemofílicos humanos. Anticuerpos anti-($Asp^{348}$-$Lys^{362}$) pueden interferir con la proteólisis o con el sitio de interacción FX ($Me^{337}$-$Ar^{372}$) (Saenko *et al.*, 1999 y Scandella *et al.*, 2000).

Se midió la actividad neutralizante de FVIII en las 13 preparaciones de Ig. Siete preparaciones de Ig mostraron inhibición de la actividad procoagulante, siendo estás específicas para los residuos de aminoácido $Cys^{711}$-$Asp^{725}$, $Tyr^{1681}$-$Arg^{1696}$ y $Arg^{1797}$-$Tyr^{1815}$ respectivamente. La secuencia $cys^{711}$-$Asp^{725}$ contiene tirosinas sulfatadas en $Tyr^{718}$, $Tyr^{719}$ y $Tyr^{723}$, y se solapa con la región HC de FVIII $Lys^{713}$-$Arg^{740}$ que se describe que promueve tanto la activación como la proteólisis de HC. Pueden requerirse grupos sulfatados adicionales para la interacción apropiada con trombina u otro componente como en el complejo de activación de FX. La secuencia también se solapa con la región $Gly^{701}$-$Ser^{750}$, reconocida por un anticuerpo monoclonal de ratón débilmente inhibidor. El péptido P8 ($Tyr^{1681}$-$Arg^{1696}$) (LC de FVIII) incluye la secuencia $Glu^{1684}$-$Arg^{1689}$ ya descrita por Shima *et al.*, 1991. Contiene el sitio de activación de trombina $Arg^{1689}$-$Ser^{1690}$. P4 ($cys^{711}$-$Asp^{725}$) también se incluye en la secuencia $Asp^{712}$-$Ala^{736}$ detectada mediante

el análisis del repertorio de anticuerpos del paciente mediante tecnología de presentación en fago de genes. Se propone como un posible inhibidor adicional en pacientes (van den Brink *et al.*, 2000). El péptido P9 ($Arg^{1797}$-$Tyr^{1815}$) contiene el sitio de unión de FXa (véase a continuación).

De las 16 inmunoglobulinas anti-péptido de FVIII purificadas a partir de seres humanos o producidas en conejos, 7 neutralizaron la actividad de FVIII en las condiciones de prueba. Usando pequeñas secuencias de péptido y ensayos de inmunounión, se han proporcionado pruebas de nuevos epítopos adicionales. Se han ubicado nuevos epítopos en el dominio A1 (residuos $ser^{109}$-$Cys^{127}$), el dominio A2 ($Cys^{407}$-$Lys^{425}$) y el dominio B ($Ser^{817}$-$Ser^{830}$ y $Glu^{1078}$-$Pro^{1092}$).

Se han notificado autoanticuerpos inmunopurificados con FVIII desnaturalizado en sujetos sanos y en conjuntos de inmunoglobulinas humanas normales (fracción procesada II, véase anteriormente) (Algiman *et al.*, 1992 y Moreau *et al.*, 2000). Se sugirió un posible papel en el aclaramiento de FVIII desnaturalizado o sus fragmentos del torrente sanguíneo y/o en la inmunotolerancia.

La identificación de los epítopos de FVIII es un desafío importante que cumplir con el fin de mejorar el tratamiento con FVIII y la calidad de los concentrados de FVIII terapéuticos. Las secuencias de epítopos de FVIII ayudan a determinar la contribución de Ig anti-FVIII policlonales del paciente para superar la actividad inhibidora y reguladora. También podrían usarse para monitorizar el cambio habitual en la especificidad anti-FVIII en un paciente durante el tratamiento. Dicha caracterización de los epítopos de FVIII y un modelo de sus ubicaciones en la molécula plegada mejora el tratamiento de inhibidores en pacientes tanto hemofílicos como no hemofílicos (detección, seguimiento, uso terapéutico de péptidos de epítopos de FVIII...).

Tabla 1 Caracterización de los anticuerpos anti-péptidos de FVIII de conejo

| **SEQ ID(a)** | **Antisuero de conejo (b)** | **Título de ELISA (c)** | | **Dominio de FVIII reconocido (d)** | **Recuperación de RAP-IgG (e) µg/ml de suero** | **Título de inhibidor (f) BU/mg** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **P-KLH** | **r-FVIII** | | | |
| SEQ ID 11 | RAP1 | 2,5 | 2,2 | A1 | 27 | - |
| SEQ ID 14 | RAP2 | 3,6 | 2,5 | A1/a1 | 55 | 1,5 |
| SEQ ID 15 | RAP3 | 2,5 | 3,2 | A2 | 268 | - |
| SEQ ID 19 | RAP4 | 2,5 | 1,3 | A2/a2 | 12 | - |
| SEQ ID 21 | RAP5 | 4,6 | 3,9 | B | 106 | - |
| SEQ C | RAP6 | 3,8 | 2,9 | - | 14 | - |
| SEQ ID 01 | RAP7 | 3,9 | 3,9 | a3 ↓ | 35 | 0,5 |
| SEQ ID 02 | RAP8 | 1,9 | 0,9 | a3/A3 ↓ | 3 | - |
| SEQ ID 05 | RAP9 | 3,8 | 2,6 | A3 | 42 | - |
| SEQ ID 23 | RAP10 | 3,9 | 0,8 | - | 65 | - |
| SEQ ID 22 | RAP11 | ND | ND | ND | ND | ND |
| SEQ ID 26 | RAP12 | 4,1 | 1,1 | C2 | ND | ND |
| SEQ ID 27 | RAP13 | 3,7 | 1,1 | C2 | ND | ND |
| SEQ ID 28 | RAP14 | 3,8 | 0,9 | C2 | ND | ND |
| SEQ ID 31 | RAP15 | 3,2 | 0,7 | C2 | ND | ND |
| SEQ ID 32 | RAP16 | 3,5 | 1,8 | C2 | ND | ND |
| SEQ ID 33 | RAP17 | 4,8 | 1,2 | C2 | ND | ND |

**Tabla 2 Caracterización de autoanticuerpos anti-péptidos de FVIII humanos**

| SEQ ID (a) | Ig antipéptido humana (b) | Reactividad de FVIII en la inmunotransferencia (-trombina) (c) (+trombina) (d) | | Dominio de FVIII (e) | Recuperación de HAP-IgG (f) μg/10 mg de IgG | Actividad inhibidora de FVIII (g) BU/mg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SEQ ID 11 | HAP1 | >92 kDa | 50 kDa | A1 | 0,27 | - |
| SEQ ID 14 | HAP2 | >92 kDa | 50 kDa | A1/a1 | 1,07 | 3,4 |
| SEQ ID 15 | HAP3 | >92 kDa | 44 kDa | A2 | 0,06 | - |
| SEQ ID 19 | HAP4 | 92 kDa | 44 kDa | A2/a2 | 0,12 | + |
| SEQ ID 21 | HAP5 | >100 kDa | - | B | 0,26 | - |
| SEQ C | HAP6 | - | - | - | 0,03 | - |
| SEQ ID 01 | HAP7 | 80 kDa | 80 kDa | a3 ↓ | 0,20 | - |
| SEQ ID 02 | HAP8 | 80 kDa | 80 kDa | a3/A3 ↓ | 0,01 | + |
| SEQ ID 05 | HAP9 | 80 kDa | 72 kDa | A3 | 0,08 | + |
| SEQ ID 23 | HAP10 | - | - | - | 0,11 | - |
| SEQ ID 22 | HAP11 | ND | ND | ND | 0,98 | 4,3 |
| SEQ ID 26 | HAP12 | ND | ND | ND | ND | ND |
| SEQ ID 27 | HAP13 | ND | ND | ND | ND | ND |
| SEQ ID 28 | HAP14 | ND | ND | ND | ND | ND |
| SEQ ID 31 | HAP15 | ND | ND | ND | ND | ND |
| SEQ ID 32 | HAP16 | 80 kDa | 72 kDa | A3C1C2 | 2,40 | 6,3 |
| SEQ ID 33 | HAP17 | ND | ND | ND | 1,06 | 2,4 |
| +: Inhibición > 25% a 100 μg/ml | | | | | | |

**Bibliografía**


- Algiman, M., *et al.* (1992) Proc Natl Acad Sci USA. 89, 3795-3799
- Dietrich, G., *et al.* (1992), Blood 79, 2946-2951
- Ewenstein, B.M., *et al*. (2000), Haematologica 85 (supl. 10), 35-39
- Foster, PA and Zimmerman, T.S. (1989), Blood Reviews 3, 190-191
- Janin, J. (1979) Nature 277, 491-492
- Karplus, PA and Schulz, GE. (1985) Naturwissenschaften 72, 212
- Knobf, P. and Derfler, K (1999), Vox Sanguinis 77 (supl. 1), 57-64
- Laub, R., *et al.* (1999) Thromb Haemost. 81, 39-44
- Lollar P. (2000), Haematol. 85 (suppl 10), 26-30
- Moreau, A., *et al.* (2000) Blood 95, 3435-3441
- Morrisson and Ludlam. (1995), Br J Haematol. 89, 231-6
- Palmer, DS, *et al.* (1997) Vox Sang. 72, 148-161
- Parker, JMR, *et al.* (1986) Biochem. 25, 5425-5432
- Peerlinck, K. *et al.* (1997), Thromb Haemost 77, 80-86
- Pemberton, S., *et al.* (1997), Blood 89, 2413-2421
- Pratt KP. (2000), Curr. Opinion Drug Discovery & Development 3, 516-526
- Raut, S., *et al.* (1998), Thromb Haemost. 80, 624-631
- Reding, MT, *et al.* (2000), Thromb Haemost. 84, 643-52
- Reisner, HM, *et al.* In: Aledort LM *et al*, eds. Inhibitors to coagulation factors. Nueva york, NY: Plenum Press (1995), 65-78
- Saenko, EL, *et al.* (1999), TCM 9, 185-192

- Scandella, D.(2000), Semin Thromb Haemost. 26, 137-142

- Shima, M., *et al.* (1991), Int J Haematol. 54, 515-522

- Toole *et al.* (1984) Nature 312, 342-7

- Tuddenham, EG and McVey, JH. (1998) Hemophilia 4, 543-545

- van den Brink, EN, *et al.* (2000) Blood. 96, 540-545

- Van Regenmortel, Methods: A. companion to Methods in Enzymology, 9, páginas 465-472, 1996

- Verhar *et al.* (1984) Nature 312, 339

- Vermylen J. (1998), Hemophilia 4, 538-542

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Departement central de fractionnement de la Croix-Rouge S.C.R.L.

Laub, Ruth

Di Gianbattista, Mario

<120> EPÍTOPOS ANTIGÉNICOS DEL FACTOR VIII, INHIBIDORES DIRIGIDOS CONTRA DICHOS EPÍTOPOS Y USO DE LOS MISMOS

<130> P.CDFR.02B/WO.Ext

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Arg Asp Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp
1               5                   10                  15

Tyr
```

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
1               5                   10                  15
```

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr
1               5                   10
```

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe
1 5

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro
1 5 10 15

Asn Glu Thr Lys Thr Tyr
20

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe
1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Thr Lys Ser Trp Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala
1 5 10 15

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg
1 5

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His
1 5 10

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys
1 5 10 15

Glu Asp Asp Lys Val
20

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
1 5 10

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln
1 5 10 15

Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala
20 25

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu
1 5 10 15

Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
20 25

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg
1 5 10 15

Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys
20

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gly Arg Gly Asn Gln
1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
1 5

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Glu Asp
1 5 10 15

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser
1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Asp Asp Pro Ser Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser
1 5 10

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser
1 5 10 15

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr
1 5 10 15

Asn

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

```
Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
1               5                   10                  15

Arg Pro Gln
```

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

```
Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser
1               5                   10                  15

Leu
```

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

```
Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu
1               5                   10
```

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
1               5
```

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1 5 10 15

Ser

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Epítopo antigénico de la secuencia de polipéptido de FVIII comprendida entre isoleucina 2262 y glutamina 2270 inclusive, definida por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 30:

Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln

1 5

2. Conjunto de epítopos antigénicos de la secuencia de polipéptido del factor VIII que comprende el epítopo antigénico del factor VIII según la reivindicación 1 y uno o más epítopos antigénicos del factor VIII seleccionados del grupo que consiste en:

- el epítopo arginina 1648 a tirosina 1664 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No:1 :

Arg Asp Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr

1 5 10 15

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del tetrapéptido Arg-Asp-Ile-Thr o uno o dos de los últimos aminoácidos del péptido Asp-Tyr

- el epítopo ácido aspártico 1681 a arginina 1696 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQID No: 2:

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg

1 5 10 15

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del epítopo Asp-Glu-Asp-Glu

- el epítopo treonina 1739 a tirosina 1748 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 3:

Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr

1 5 10

- el epítopo asparagina 1777 a fenilalanina 1785 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 4:

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe

1 5

posiblemente con deleción de uno o dos aminoácidos del dipéptido terminal Ser-Phe o el tetrapéptido Pro-Tyr-Ser-Phe

- el epítopo ácido glutámico 1794 a tirosina1815 inclusive, definido por SEQ ID No: 5:

Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro

1 5 10 15

Asn Glu Thr Lys Thr Tyr

20

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del primer tripéptido Glu-Asp-Gln o el primer nonapéptido Glu-Asp-Gln-Arg-Gln-Gly-Ala-Glu-Pro

- el epítopo metionina 1823 a ácido aspártico 1831, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 6:

Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp

1 5

- el epítopo ácido glutámico 1885 a fenilalanina 1891 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 7:

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe

1 5

- el epítopo ácido glutámico 1885 a alanina 1901 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 8:

Glu Thr Lys Ser Trp Phe Thr Glu Asn Met. Glu Arg Asn Cys Arg Ala

1 5 10 15

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del heptapéptido Gly-Thr-Lys-Ser-Trp-Phe-Thr o del tripéptido Cys-Arg-Ala

- el epítopo ácido aspártico 1909 a arginina 1917 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 9:

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg

1 5

- el epítopo comprendido entre serina 2018 e histidina 2031 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 10 :

Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His

1 5 10

- el epítopo alanina 108 a valina 128 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 11:

Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys

1 5 10 15

Glu Asp Asp Lys Val

20

posiblemente con deleción de los aminoácidos terminales alanina y/o valina

- el epítopo ácido glutámico181 a leucina 192 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQID No : 12 :

Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu

1 5

posiblemente con deleción de uno o dos aminoácidos del dipéptido terminal Thr-Leu

- el epítopo ácido aspártico 203 a alanina 227 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 13 :

Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln
1 5 10 15
Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala
20

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del nonapéptido Asp-Arg-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Arg-Ala

- el epítopo ácido aspártico 327 a metionina 355 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 14 :

Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu
1 5 10 15
Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
20 25

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del dipéptido Asp-Ser o el octapéptido Asp-Asp-Leu-Thr-Asp-Ser-Glu-Met

- el epítopo ácido aspártico 403 a lisina 425 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 15 :

Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg
1 5 10 15
Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys
20

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del tetrapéptido Asp-Asp-Arg-Ser

- el epítopo valina 517 a arginina 527 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 16 :

Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
1 5 10

posiblemente con deleción de uno o los dos aminoácidos del dipéptido Pro-Arg

- el epítopo tirosina 555 a glutamina 565 inclusive definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 17 :

Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gly Arg Gly Asn Gln
1 5 10

- el epítopo histidina 693 a glicina 701 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 18

His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
1 5

- el epítopo serina 710 a ácido aspártico 725 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 19

Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Glu Asp
1 5 10 15

- el epítopo leucina 730 a serina 741 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 20 :

Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser
1 5 10

posiblemente con deleción del aminoácido terminal serina y/o el primer aminoácido leucina

- el epítopo serina 817 a serina 830 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 21 :

Ser Asp Asp Pro Ser Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser
1 5 10

- el epítopo isoleucina 2081 a serina 2095 inclusive, definido por la siguiente secuencia

SEQ ID No: 22:

Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser
1 5 10 15

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del tetrapéptido Ile-His-Gly-ile

- el epítopo tirosina 2105 a glicina 2121 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 23:

Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
1 5 10 15
Gly

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del tripéptido Tyr-Ser-Leu

- el epítopo ácido asparagina 2128 a ácido asparagina 2138 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 24:

Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
1 5 10

- el epítopo histidina 2152 a arginina 2163 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 25:

His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
1 5 10

- el epítopo serina 2181 a asparagina 2198 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No : 26:

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
1 5 10 15

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del tripéptido terminal Phe-Thr-Asn(P11)

- el epítopo serina 2204 a glutamina 2222 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 27:

Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp

1 5 10 15

Arg ProGln

- el epítopo glutamina 2235 a leucina 2251 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 28 :

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu

1 5 10 15

posiblemente con deleción de uno o dos aminoácidos del dipéptido terminal Ser-Leu o uno o más aminoácidos del tetrapéptido Val-Lys-Ser-Leu

- el epítopo glicina 2242 a leucina 2251 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 29 :

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu

1 5 10

posiblemente con deleción de uno o dos aminoácidos del dipéptido terminal Ser-Leu

- el epítopo leucina 2273 a serina 2289 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 31 :

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp

1 5 10 15

Ser

- el epítopo prolina 2292 a tirosina 2305 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 32:

Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr

1 5 10

posiblemente con deleción de uno o más aminoácidos del tripéptido terminal Thr-Arg-Tyr

- el epítopo ácido glutámico 2322 a tirosina 2332 inclusive, definido por la siguiente secuencia:

SEQ ID No: 33:

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1 5 10

3. Epítopo conformacional que contiene al menos el epítopo según la reivindicación 1 y uno o más epítopos seleccionados del conjunto de epítopos de la reivindicación 2.

4. Factor VIII recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos en la que el epítopo antigénico según la reivindicación 1 y posiblemente uno o más epítopos adicionales seleccionados del conjunto de epítopos de la reivindicación 2 se deleciona(n).

5. Complejo que comprende una proteína portadora o un péptido portador unido a un epítopo según la reivindicación 1 ó 3.

6. Inhibidor de una secuencia de polipéptidos del factor VIII que se une al epítopo de la reivindicación 1 y posiblemente también al conjunto de epítopos de la reivindicación 2, o al epítopo conformacional de la reivindicación 3.

7. Inhibidor según la reivindicación 6, que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-factor VIII.

8. Anti-inhibidor, que se dirige contra el inhibidor del factor VIII según la reivindicación 6 ó 7.

9. Anti-inhibidor según la reivindicación 8, que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-idiotipo-anti-factor VIII.

10. Composición farmacéutica, que comprende un portador farmacéutico adecuado y al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en el epítopo antigénico, el conjunto de epítopos, el complejo, el factor VIII recombinante, el inhibidor y/o el anti-inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9.

11. Dispositivo de purificación y/o de diagnóstico, que comprende al menos un elemento que se selecciona del grupo que consiste en la secuencia de epítopo, las secuencias del conjunto de epítopos, el complejo, el inhibidor y/o el anti-inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9.

12. Dispositivo según la reivindicación 11, que es un kit de diagnóstico.

13. Dispositivo según la reivindicación 11, que es un filtro o una columna de cromatografía.

14. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 10 para la fabricación de un medicamento en el tratamiento y/o la prevención de hemofilia en un mamífero inducida por inhibidores de secuencia de polipéptido del factor VIII.

15. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de hemofilia en un mamífero inducida por los inhibidores de secuencia de polipéptido del factor VIII.

16. Método *in vitro* para el tratamiento de un fluido fisiológico (suero), obtenido de un paciente mamífero (incluyendo un ser humano), en el que dicho fluido fisiológico se pone dentro de la columna de cromatografía según la reivindicación 13 con el fin de permitir una unión de los inhibidores de secuencia de polipéptido del factor VIII presentes en dicho fluido fisiológico con el epítopo, conjunto o complejo comprendido en dicha columna de cromatografía en el que tras la elución de la columna se recupera un fluido fisiológico sin inhibidores de secuencia de polipéptido del factor VIII.

17. Procedimiento para identificar y obtener inhibidores y/o anti-inhibidores según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 6 a 9, que comprende las etapas de:

- seleccionar un elemento del grupo que consiste en el epítopo, el conjunto de epítopos y/o el complejo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, unido a un soporte sólido (preferiblemente un soporte sólido de una columna de cromatografía),

- hacer pasar un fluido fisiológico (suero) obtenido de un paciente que contiene inhibidores de secuencia de polipéptido del factor VIII a través de dicha columna de cromatografía,

- eluir dicha columna, y

- recoger las fracciones que contienen inhibidores de secuencia de polipéptido del factor VIII que han mostrado una inmunoafinidad con dicho elemento.

18. Procedimiento según la reivindicación 16, que comprende además las etapas de:

- unir los inhibidores recogidos del factor VIII sobre un soporte sólido (preferiblemente un soporte sólido de una columna de cromatografía),

- hacer pasar un fluido fisiológico de un paciente mamífero que contiene anti-inhibidores del factor VIII sobre dicho soporte sólido,

- lavar el soporte, preferiblemente eluyendo dicha columna, y

- recoger las fracciones que contienen anti-inhibidores del factor VIII que han mostrado una inmunoafinidad con dichos inhibidores del factor VIII.

19. Uso del dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 13, para purificar FVIII.

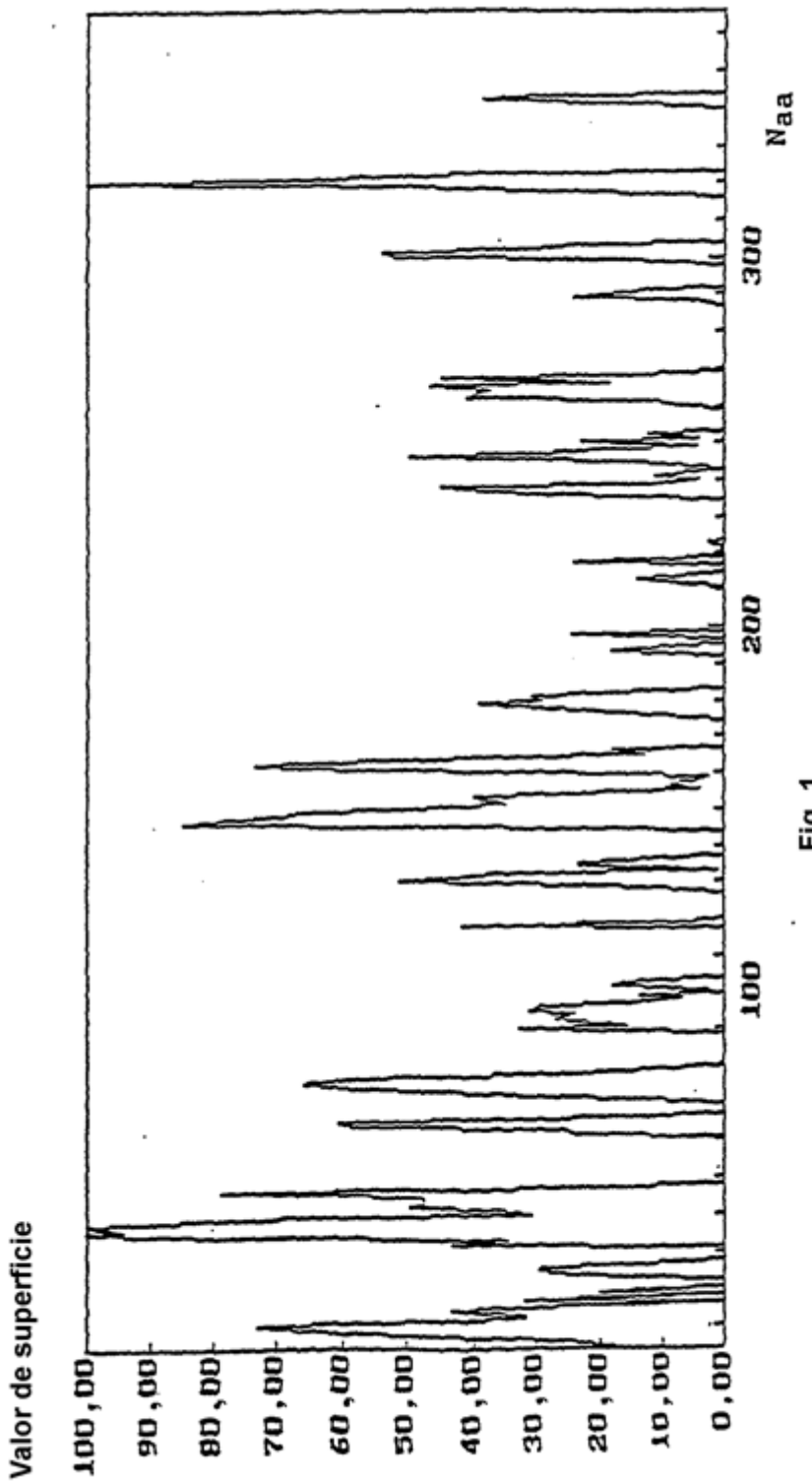
Valor de superficie
100,00
90,00
80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
100
200
300
Naa

Fig. 1

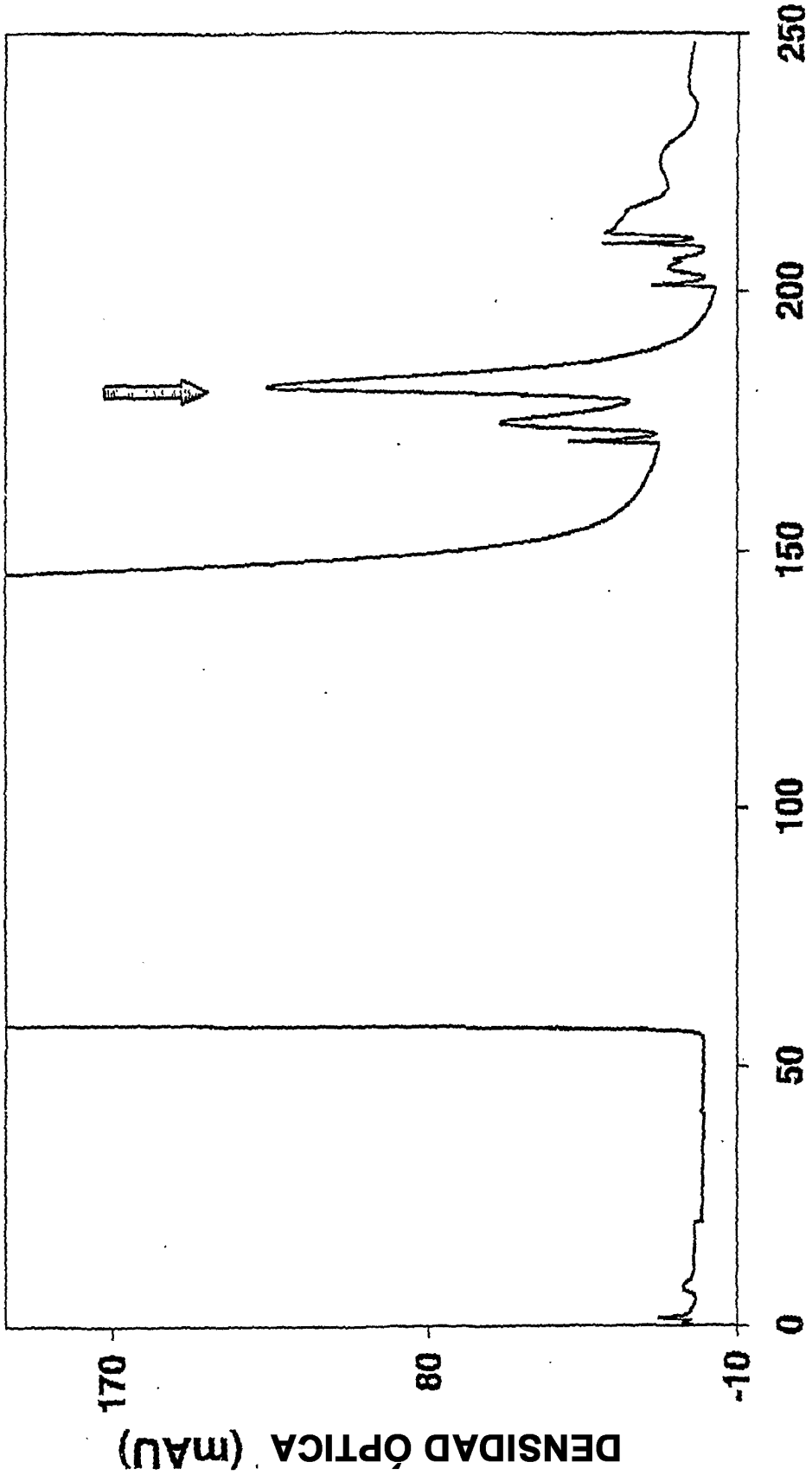
DENSIDAD ÓPTICA (mAU)
170
80
-10
0
50
100
150
200
250
VOLUMEN DE ELUCIÓN (ml)

fig.2a

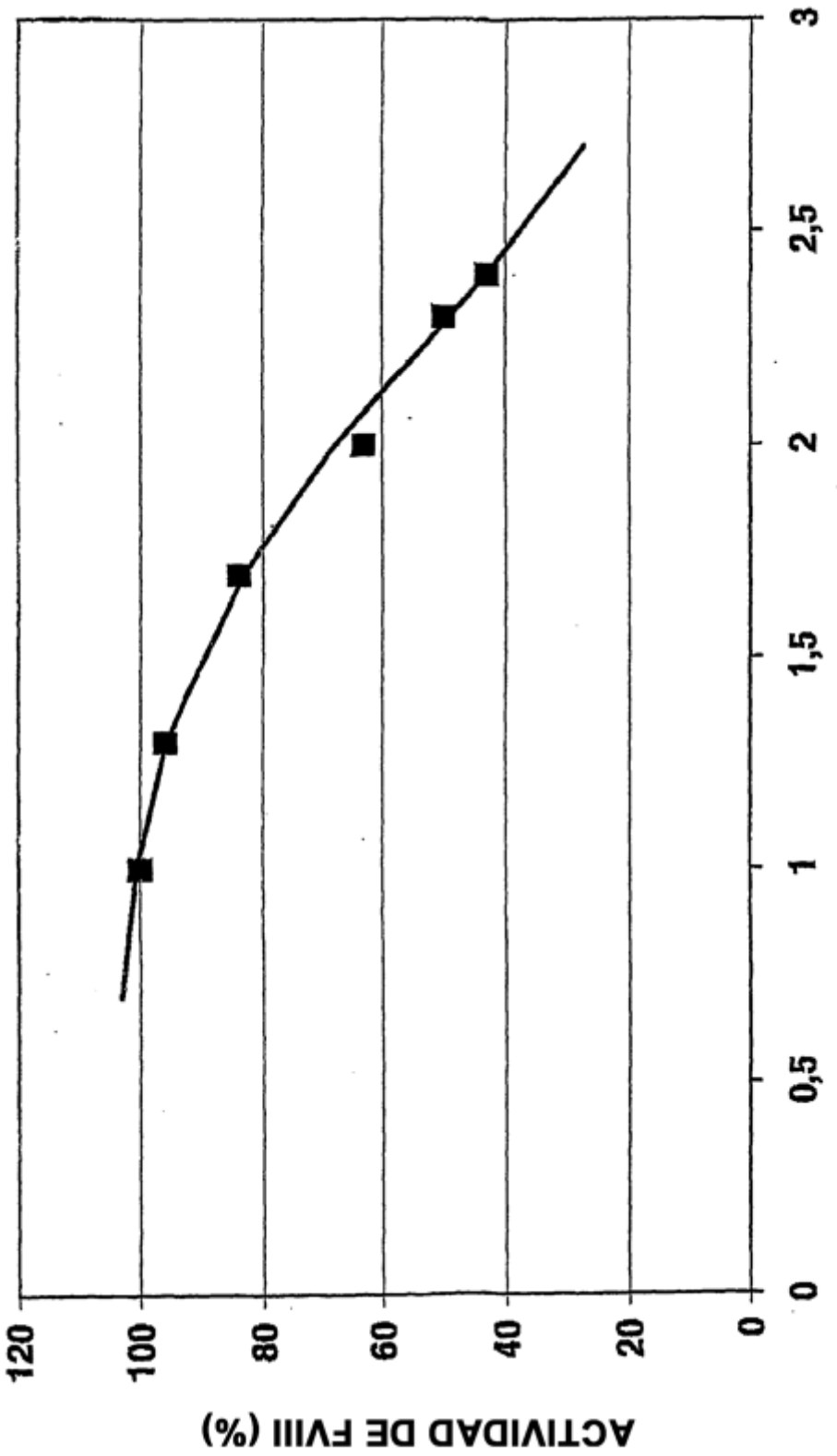
ACTIVIDAD DE FVIII (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
Log IgG (µg/ml)

Fig. 2b

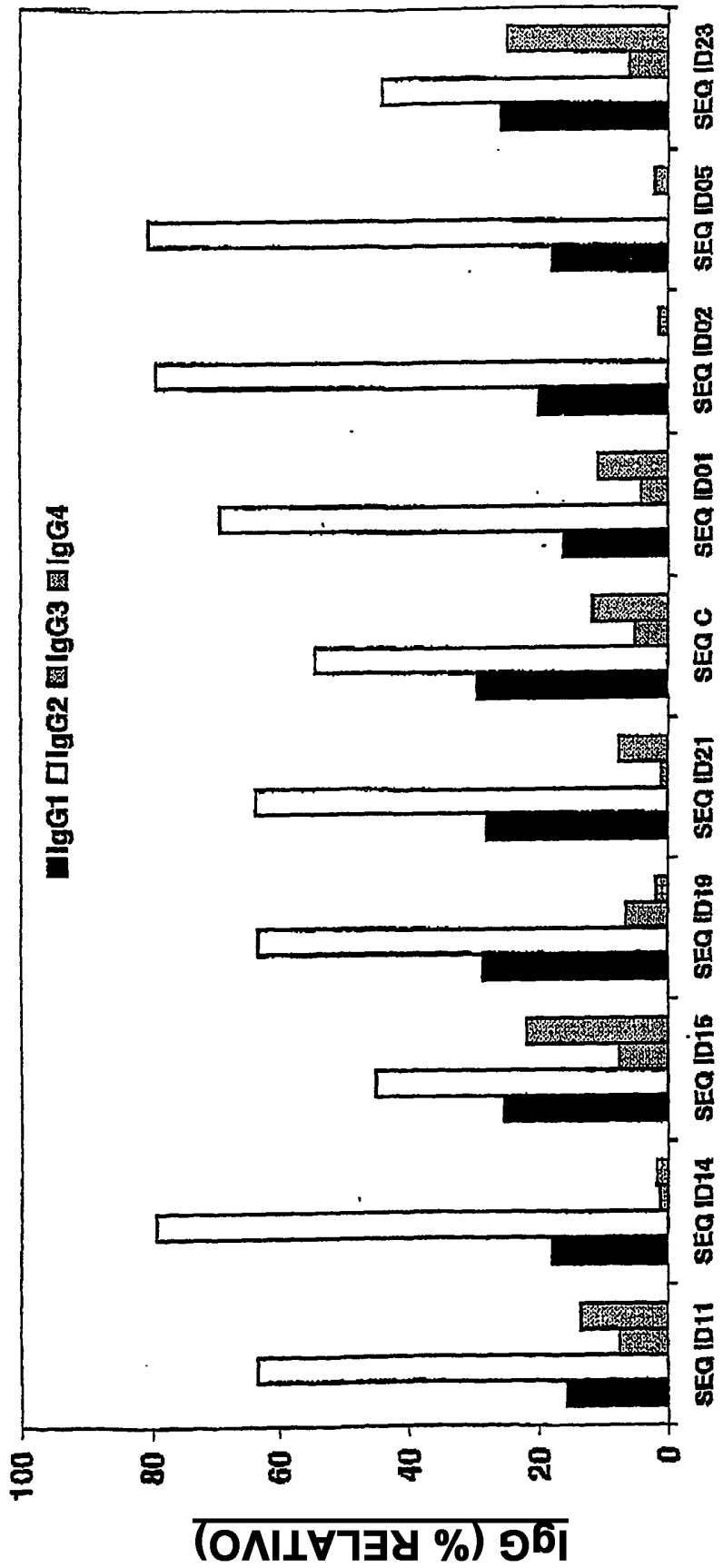
IgG (% RELATIVO)
100
80
60
40
20
0
IgG1 IgG2 IgG3 IgG4
SEQ ID11
SEQ ID14
SEQ ID15
SEQ ID19
SEQ ID21
SEQ C
SEQ ID01
SEQ ID02
SEQ ID05
SEQ ID23

Fig. 3

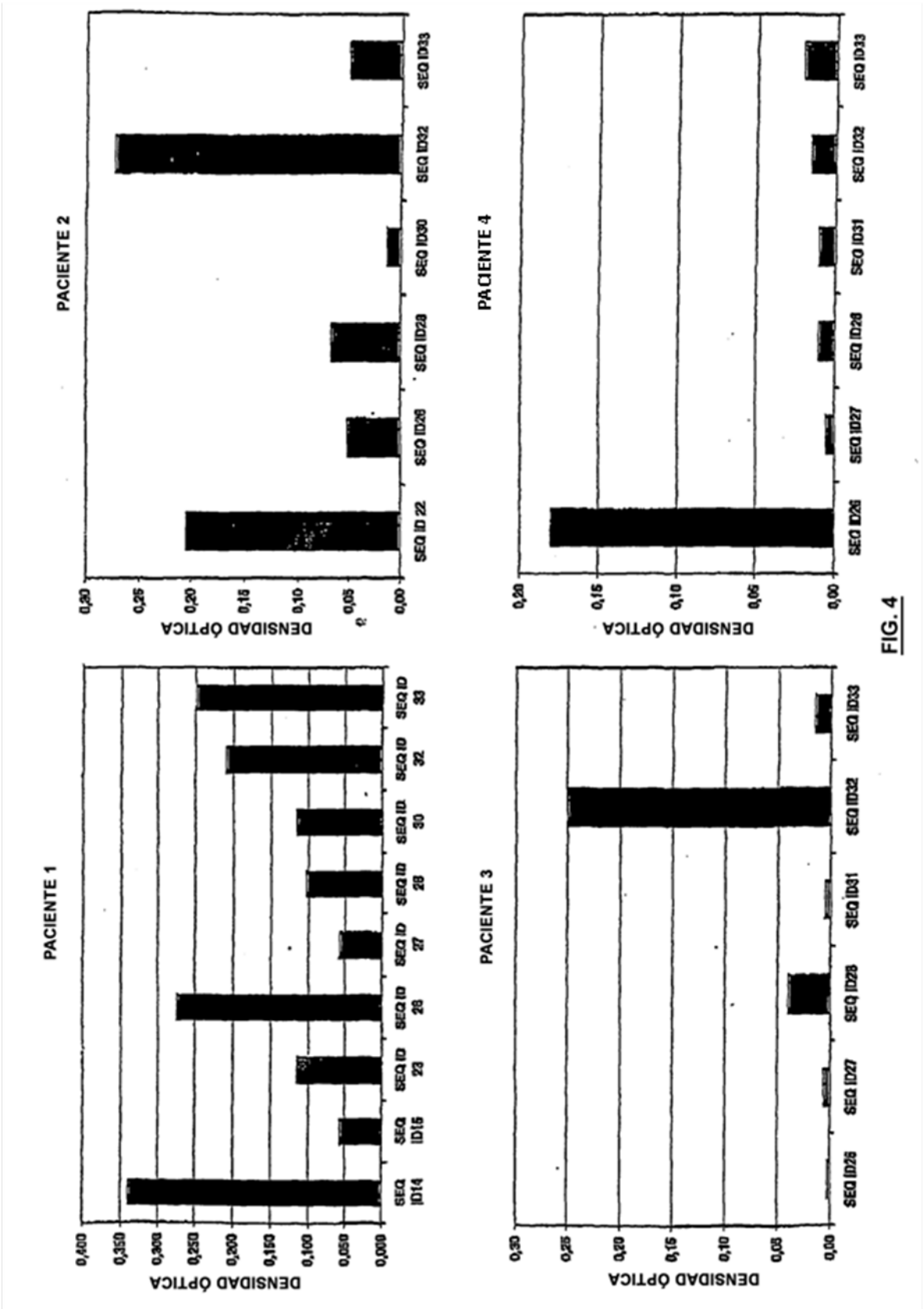
PACIENTE 1
PACIENTE 2
PACIENTE 3
PACIENTE 4
DENSIDAD ÓPTICA
SEQ ID 14
SEQ ID 15
SEQ ID 23
SEQ ID 26
SEQ ID 27
SEQ ID 28
SEQ ID 30
SEQ ID 32
SEQ ID 33
SEQ ID 22
SEQ ID 26
SEQ ID 28
SEQ ID 30
SEQ ID 32
SEQ ID 33
SEQ ID 26
SEQ ID 27
SEQ ID 28
SEQ ID 31
SEQ ID 32
SEQ ID 33

FIG. 4