

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 881**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/755** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2013 PCT/IB2013/060060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072958**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2013 E 13795002 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2917232**

54 Título: **Péptidos derivados del factor VIII para uso en el tratamiento de la hemofilia A**

30 Prioridad:

**12.11.2012 GB 201220328**  
**19.09.2013 GB 201316660**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.07.2017**

73 Titular/es:

**APITOPE INTERNATIONAL NV (100.0%)**  
**Campus Diepenbeek Agoralaan**  
**3590 Diepenbeek, BE**

72 Inventor/es:

**WRAITH, DAVID y**  
**STREETER, HEATHER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 626 881 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**

Péptidos derivados del factor VIII para uso en el tratamiento de la hemofilia A

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos, al menos parte de los cuales puede derivarse del factor VIII (FVIII). Los péptidos se pueden usar para reducir o prevenir la formación de anticuerpos inhibidores del factor VIII, por ejemplo, en el tratamiento de la hemofilia A y de la hemofilia adquirida.

10

Antecedentes de la invención

## HEMOFILIA

15 La hemofilia pertenece a un grupo de trastornos sanguíneos hereditarios entre los que se incluyen la hemofilia A, la hemofilia B (enfermedad de Christmas) y la enfermedad de Von Willebrand.

En la hemofilia, la capacidad de la sangre para coagularse se ve gravemente reducida debido a la falta parcial o total de un factor de coagulación esencial, produciendo un aumento del tiempo de sangrado.

20

La hemofilia A es una deficiencia del factor de coagulación VIII, mientras que la hemofilia B es una deficiencia del factor de coagulación IX. En ambas enfermedades, el gen defectuoso se encuentra en el cromosoma X, por lo que las afecciones están ligadas al cromosoma X. La hemofilia A es cinco veces más común que la hemofilia B.

25 La hemofilia es una afección genética hereditaria que dura toda la vida, que afecta a las mujeres como portadoras y a los varones que heredan la afección. Aproximadamente una tercera parte de los nuevos diagnósticos se da en casos en los que no hay antecedentes familiares. Aparece en todo el mundo y se produce en todos los grupos étnicos. Aproximadamente 6.000 personas padecen hemofilia en el R.U.

30 Las personas hemofílicas tienen hemorragia durante un período prolongado tras una lesión. Las lesiones externas tales como cortes y rasguños normalmente no plantean problemas graves: suele ser posible detener la hemorragia aplicando cierto grado de presión y cubriendo la zona afectada (por ejemplo, con un parche).

35 El principal problema es la hemorragia interna de las articulaciones, en los músculos y en los tejidos blandos, que se produce espontáneamente. La hemorragia interna, tal como la hemorragia cerebral, es muy difícil de tratar y puede ser mortal. La hemorragia repetida en las articulaciones produce dolor agudo y puede producir artritis y/o daño articular a largo plazo que conduce a discapacidad.

40 Normalmente, el tratamiento de la hemofilia se realiza mediante el reemplazo del factor de coagulación que falta. En la hemofilia leve o moderada, se pueden administrar inyecciones en el momento en que se produce una hemorragia (terapia a demanda). Sin embargo, en la hemofilia grave, se administran inyecciones profilácticas regulares para ayudar a que se coagule la sangre y reducir al mínimo la probabilidad de daño articular a largo plazo.

45 Una complicación potencialmente grave de la terapia de reemplazo de factores de coagulación para la hemofilia A es el desarrollo de anticuerpos que neutralizan la función procoagulante del factor VIII. Los inhibidores del factor VIII se producen en aproximadamente el 25 % de las personas con hemofilia A grave. Dado que los pacientes con hemofilia A congénita pueden ser genéticamente deficientes en el FVIII, la síntesis de inhibidores es una respuesta aloinmunitaria frente a la proteína foránea administrada para prevenir o tratar los episodios hemorrágicos.

50 Los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria hacia FVIII. Tras ser captado por las células presentadoras de antígeno (APC), FVIII sufre la degradación proteolítica en los fragmentos peptídicos (Reding *et al.*, (2006) "Haemophilia" 12 (sup. 6) 30-36). A continuación, estos péptidos se presentan en la superficie de la APC en asociación con moléculas de MHC de clase II. Este complejo es reconocido luego por el receptor de los linfocitos T de una célula CD4+ específica del FVIII. En presencia de las señales coestimulantes apropiadas, este reconocimiento provoca en última instancia que la célula CD4+ dirija la síntesis de los anticuerpos por los linfocitos B.

55 La incidencia de formación de inhibidores aumenta inicialmente con el número de tratamientos con el factor VIII, pero parece hacerse estable tras de 50 a 100 días de exposición. La formación de inhibidores es mucho más común en la hemofilia grave que en la enfermedad moderada o leve, y algunos defectos moleculares, en concreto, las grandes eliminaciones y las mutaciones sin sentido en la cadena ligera del factor VIII, parecen predisponer a la formación de inhibidores. Los parámetros tales como la concentración, el tipo (purificado o recombinante) del factor de reemplazo, y el historial de tratamientos también pueden afectar a la probabilidad de producción de anticuerpos.

65 El tratamiento de pacientes con hemofilia con inhibidores es un desafío continuo. La inducción de la tolerancia inmunitaria (ITI) usando una técnica de desensibilización es satisfactoria en algunos pacientes con aloanticuerpos

contra el factor VIII. Dicha metodología terapéutica requiere la exposición continua a la terapia de reemplazo del factor, pues se trata de una estrategia a largo plazo.

5 Aunque la ITI puede ser satisfactoria, una proporción significativa (aproximadamente el 30 %) de los pacientes no responde a la ITI. Es mucho menos probable que los pacientes con altos títulos de inhibidor respondan al tratamiento. Otro factor que contribuye de manera significativa es la edad al inicio de la ITI, con tasas de éxito enormemente reducidas cuando el paciente tiene más de 20 años (Hay *et al* (2005) "Seminars in Thrombosis and Hemostasis" 32:15-21).

10 Cuando la terapia con ITI es insatisfactoria, el inhibidor, en general, persiste durante toda la vida, y debido a que dichos pacientes normalmente tienen un nivel alto de respuesta, es necesario tratar episodios de hemorragia con productos antihemorrágicos de FVIII, tales como concentrados de complejo de protrombina activada (FEIBA™) y FVII activado recombinante. Sin embargo, el uso de dichos agentes está asociado con acontecimientos adversos tales como la coagulación intravascular diseminada, el infarto agudo de miocardio, el émbolo pulmonar y la trombosis (Acharya y DiMichele (2006) "Best Practice & Research Clinical Haematology" 19:51-66).

15 A veces, se usa la terapia inmunosupresora para los pacientes que no responden a ITI. El tratamiento incluye la administración de fármacos inmunosupresores tales como la ciclofosfamida, la prednisona, la azatioprina y la ciclosporina, que se dirigen inespecíficamente al sistema inmunitario. Estos tratamientos pueden tener efectos secundarios asociados con la inmunosupresión general.

20 Existe un interés renovado en el agotamiento selectivo de los linfocitos B usando Rituximab™, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el antígeno CD20 de los linfocitos B. Sin embargo, se han dado casos de enfermedad del suero e infecciones oportunistas en algunos niños tratados con este fármaco (DiMichele (2007) *J Thromb Haemost* 5:143-50).

#### HEMOFILIA ADQUIRIDA

30 La hemofilia adquirida es una afección autoinmunitaria rara que afecta a entre 1 y 4 personas por millón. En dicha afección, los sujetos que no han nacido con hemofilia desarrollan anticuerpos contra uno de los factores de coagulación tales como el factor VIII. Se cree que el embarazo y las enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide y el cáncer pueden aumentar el riesgo de desarrollar hemofilia adquirida. Aunque hay diferencias en los mecanismos inmunitarios subyacentes que conducen a su producción, las manifestaciones clínicas de los inhibidores de FVIII producidos en respuesta a la terapia de reemplazo de los factores de coagulación y los producidos en la hemofilia adquirida son similares.

35 Los pacientes con hemofilia adquirida tienen una tasa de mortalidad que se acerca al 25 %, debido, en parte, a la asociación de los inhibidores adquiridos con complicaciones hemorrágicas graves. La terapia de inhibidores de autoanticuerpos adquiridos se basa principalmente en la necesidad de controlar o prevenir las complicaciones hemorrágicas agudas, que, con frecuencia, son mortales y predisponen a la amputación para erradicar el autoanticuerpo con el fin de restablecer la coagulación normal.

40 Algunas hemorragias asociadas con inhibidores de autoanticuerpo de bajo título (< 5 unidades Bethesda) se pueden tratar eficazmente con concentrados de FVIII administrados a altas dosis. El concentrado de FVIII porcino antes se consideraba una terapia de primera línea fundamental para la hemorragia relacionada con la hemofilia adquirida, puesto que era la única terapia de reemplazo que proporcionaba una oportunidad para medir realmente los niveles de actividad de coagulación de FVIII tras la infusión en el laboratorio. El producto se retiró del mercado en 2004 debido a la contaminación de los bancos de plasma porcino por el parvovirus porcino. Actualmente, los agentes "antihemorrágicos" son los usados más comúnmente, pero existen posibles riesgos de trombogenicidad y solo existe una eficacia del aproximadamente 80 % para cada producto. Se puede requerir el intercambio de plasma mediante plasmaféresis e inmunoadsorción extracorpórea para reducir temporalmente el título de inhibidor lo suficiente como para que los agentes antihemorrágicos o el reemplazo de FVIII proporcionen una hemostasia adecuada.

45 La erradicación de los inhibidores de autoanticuerpos depende de medidas inmunosupresoras tales como: (1) la administración de corticosteroides con una eficacia del 30 % al 50 % en 3-6 semanas; (2) el uso de agentes quimioterapéuticos citotóxicos y mielosupresores, por ejemplo, ciclofosfamida, ciclosporina, 2-clordesoxiadenosina; (3) la inmunomodulación con inmunoglobulina intravenosa; y (4) el agotamiento selectivo de linfocitos B con rituximab. Las personas que responden a Rituxima™ pueden necesitar el uso simultáneo de esteroides, y las recaídas pueden responder a la repetición del tratamiento.

60 Por lo tanto, todos los métodos disponibles en la actualidad para reducir la producción de autoanticuerpos asociada con el tratamiento de la hemofilia A, y la producción de autoanticuerpos en la hemofilia adquirida, tienen inconvenientes. Existe, por tanto, la necesidad de métodos mejorados para abordar la cuestión de los anticuerpos anti-FVIII en la hemofilia A y la hemofilia adquirida.

65

Los presentes inventores han encontrado que es posible prevenir la formación de anticuerpos inhibidores del FVIII mediante la inducción previa de tolerancia en el paciente con péptidos derivados de FVIII y tratar las afecciones tales como la hemofilia mediante la administración de péptidos derivados de FVIII para reducir los anticuerpos inhibidores de FVIII.

5 Sumario de los aspectos de la invención

El primer aspecto de la presente invención, por tanto, se refiere a un péptido, pudiéndose derivar al menos parte de la secuencia del mismo de FVIII, que es capaz de inducir o restablecer la tolerancia a FVIII.

10 En una primera realización del primer aspecto de la invención, la invención proporciona un péptido que comprende la secuencia derivada de FVIII DNIMVTFRNQASRPY que tiene una de las siguientes secuencias:

15 Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 17)

Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID NO: 18)

Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

20 Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 25)

Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID NO: 26)

25 Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID NO: 27)

Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 29)

Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID NO: 30) y;

30 Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID NO: 31).

En una segunda realización, la presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia derivada de FVIII PRCLTRYSSFVNME que tiene una de las siguientes secuencias:

35 Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 1)

Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu (SEQ ID NO: 2)

40 Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID NO: 3)

Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 5)

45 Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID NO: 7)

Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 9)

Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu (SEQ ID NO: 10)

50 Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID NO: 11) y

Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 13).

55 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de péptidos, que incluye uno o más péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La composición puede comprender al menos un péptido de acuerdo con la primera realización y al menos un péptido de acuerdo con la segunda realización del primer aspecto de la invención.

60 La composición puede comprender un péptido que tiene SEQ ID NO: 1 y un péptido que tiene SEQ ID NO: 17.

La combinación puede estar en forma de un kit, en el que la pluralidad de péptidos se proporciona para separado para una administración separada, posterior, secuencial o simultánea.

65 El péptido o una composición de la invención pueden ser para su uso en la supresión, la reducción o la prevención del desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el factor VIII.

En el presente documento, también se describe el uso de dicho péptido o dicha composición en la fabricación de un medicamento para la supresión, la reducción o la prevención del desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el factor VIII.

- 5 En el presente documento, también se describe un método de supresión, prevención o reducción del desarrollo de anticuerpos inhibidores del Factor VIII en un sujeto, que comprende la etapa de administrar dicho péptido o dicha composición al sujeto.

10 El sujeto puede ser deficiente en FVIII. En particular, el sujeto puede tener hemofilia A, y puede estar sometido, o a punto de estar sometido, a una terapia de reemplazo de factor VIII.

Como alternativa, el sujeto puede haber contraído, o estar en riesgo de contraer, hemofilia adquirida.

15 Los inhibidores del Factor VIII se encuentran más frecuentemente en individuos que expresan HLA-DR2. El sujeto tratado mediante el método de la invención puede ser, por tanto, HLA-DR2 positivo.

#### Descripción de las figuras

##### Figura 1: Solubilidad de péptidos FVIII modificados

20 Se ensayó un total de 32 péptidos: 16 de los cuales se basaban en el péptido FVIII PRCLTRYSSFNME ("PRCLT") (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13); y 16 de los cuales se basaban en el péptido FVIII DNIMVTRNQRSRPY ("DNIMV") (SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Se ensayó su solubilidad con relación a un péptido de control no relacionado (4Y), que se sabe que es suficientemente soluble para su aplicación como antígeno tolerante. En el diagrama, el verde representa un péptido que es al menos tan soluble como 4Y, el naranja representa un péptido que no es tan soluble como 4Y, pero que se acerca bastante, y el rojo representa un péptido que no es tan soluble como 4Y. Los péptidos codificados en verde eran tan solubles como el péptido de control 4Y, los péptidos codificados en rojo eran poco solubles, y un péptido codificado en ámbar tenía solubilidad intermedia.

##### Figura 2: Solubilidad de péptidos marcados en solución acuosa

30 Se determinó la concentración de péptido en solución después de la disolución en DMSO (control) o PBS espectrofotométricamente, y se comparó con el valor esperado de 4 mg/ml. Una mayor disparidad entre la concentración real y la esperada corresponde a una menor solubilidad relativa.

##### Figura 3: Los péptidos marcados actúan como epítopos

35 Se realizaron ensayos de presentación de antígeno con células presentadoras de antígeno recién preparadas y fijas para investigar si los péptidos marcados, al igual que los péptidos precursores PRCLT y DNIMV, son capaces de unirse a una molécula de MHC y presentarse a un linfocito T sin el procesamiento del antígeno. (a) Péptidos PRCLT; (b) péptidos DNIMV.

40 Figura 4: Los péptidos que tienen SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 regulan una respuesta de linfocitos T hacia PRCLT La figura muestra respuestas de reclutamiento procedentes de ratones transgénicos HLA-DR2 tratados bien con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o control (PBS), y estimulados con PRCLT. Los índices de estimulación de los linfocitos T se muestran a través de un intervalo de concentraciones de péptido y frente a FVIII y PPD de control.

45 Figura 5: Los péptidos que tienen SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 regulan una respuesta de linfocitos T hacia DNIMV

50 La figura muestra respuestas de reclutamiento procedentes de ratones transgénicos HLA-DR2 tratados bien con SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o control (PBS), y estimulados con DNIMV. Los índices de estimulación de los linfocitos T se muestran a través de un intervalo de concentraciones de péptido y frente a FVIII y PPD de control.

Figura 6: Los péptidos que tienen SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 regulan una respuesta de linfocitos T hacia sus péptidos precursores

55 La figura muestra respuestas de reclutamiento procedentes de ratones transgénicos HLA-DR2 tratados bien con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 17 o control (PBS), y estimulados con PRCLT y DNIMV, y reclutados *in vitro* con PRCLT, DNIMV o FVIII. Los índices de estimulación de los linfocitos T se muestran a través de un intervalo de concentraciones de péptido y frente a FVIII. Hay una inhibición significativa de las respuestas de los linfocitos T hacia los péptidos precursores.

60 Figura 7: Una combinación de un péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 y un péptido que tiene la SEQ ID NO: 17 inhibe la producción de anticuerpos anti-FVIII *in vivo*

La figura muestra el criterio de valoración de los títulos de anticuerpos anti-FVIII de los ratones tratados con una combinación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 (o control de PBS) e inmunizados con 8 inmunizaciones semanales de FVIII.

65 Figura 7a: Resultados del día 28.

Figura 7b: Resultados del día 56.

Figura 8: Una combinación de un péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 y un péptido que tiene la SEQ ID NO: 17 previene la producción de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes *in vivo* tras la exposición a FVIII.

La figura muestra los títulos de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes de los ratones tratados con una combinación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 (o control de PBS) antes de y durante las 8 inmunizaciones semanales de FVIII. El día 56, hay una reducción significativa de anticuerpos neutralizantes en los ratones tratados con péptido.

Figura 9: Una combinación de un péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 y un péptido que tiene la SEQ ID NO: 17 inhibe las respuestas de linfocitos T hacia FVIII.

La figura muestra respuestas de reclutamiento procedentes de ratones transgénicos HLA-DR2 tratados bien con una combinación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 o control (PBS), y estimulados con DNIMV y PRCLT. Los índices de estimulación de los linfocitos T se muestran a través de un intervalo de concentraciones de FVIII.

Figura 10: Una combinación de un péptido que tiene la SEQ ID N° 1 y un péptido que tiene la SEQ ID N° 17 suprime la generación de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes en un modelo animal terapéutico con una respuesta inmune a FVIII en curso

La figura muestra los niveles de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes en ratones tratados con una combinación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 o de péptido de control de fosfatasa de ácido prostático (PAP) 133-152 (secuencia descrita en el documento PCT/US2006/031961, SEQ ID NO: 15) tras la inducción de una respuesta inmune hacia FVIII y la producción de anticuerpos anti-FVIII. Los ratones recibieron tratamiento con péptido tres semanas después de la inmunización de rFVIII y antes de una inmunización de refuerzo con rFVIII. Dos semanas después de la inmunización de refuerzo de FVIII (semana 7), hay una reducción significativa de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes en los ratones tratados con péptido que se mantiene en el transcurso del experimento hasta la semana 13.

Descripción detallada

## PÉPTIDO

La presente invención se refiere a un péptido.

El término "péptido" se usa en el sentido normal para referirse a una serie de restos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí, por lo general, mediante enlaces peptídicos entre los grupos  $\alpha$ -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos peptídicos sintéticos.

El péptido de la presente invención puede prepararse usando métodos químicos ("Peptide Chemistry, A practical Textbook". Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, se pueden sintetizar péptidos mediante técnicas de fase sólida (Roberge J. Y. *et al* (1995) *Science* 269: 202-204), escindir de la resina y purificarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa (por ejemplo, Creighton (1983) "Proteins Structures And Molecular Principles", W. H. Freeman and Co, Nueva York NY). Se puede lograr la síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Como alternativa, el péptido se puede preparar mediante medios recombinantes o mediante la escisión del factor VIII, seguida de la modificación de uno o ambos extremos. La composición de un péptido puede confirmarse mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

Para fines prácticos, existen otras diversas características que el péptido puede mostrar. Por ejemplo, es importante que el péptido sea lo suficientemente estable *in vivo* como para ser útil terapéuticamente. La semivida del péptido *in vivo* puede ser de al menos 10 minutos, 30 minutos, 4 horas o 24 horas.

El péptido también puede demostrar buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido puede mantener una configuración *in vivo* que le permita unirse a una molécula de MHC en la superficie celular sin impedimento.

## EPÍTOPOS

En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T pueden reconocer epítopos internos de un antígeno proteico. Las células presentadoras de antígeno (APC) captan antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido puede unirse a una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II en el interior de la célula y transportarse hasta la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie de la célula junto con una molécula de MHC, el péptido puede ser reconocido por un linfocito T (mediante el receptor de linfocitos T (RCT)), en cuyo caso el péptido es un epítipo de linfocitos T.

Así pues, un epítipo es un péptido que se puede derivar de un antígeno que es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de MHC de clase I o II y ser reconocido por un linfocito T.

El epítopo mínimo es el fragmento más corto que se puede derivar de un epítopo, que es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de MHC de clase I o II y ser reconocido por un linfocito T. Para una región inmunogénica dada, normalmente es posible generar un "conjunto anidado" de péptidos solapantes que actúan como epítos, conteniendo todos ellos el epítopo mínimo, pero que difieren en sus regiones flanqueantes.

De igual modo, es posible identificar el epítopo mínimo para una determinada combinación de molécula de MHC: linfocito T midiendo la respuesta hacia péptidos truncado. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta hacia el péptido que comprende los restos 1-15 en la biblioteca solapante, se pueden usar conjuntos que están truncados en ambos extremos (es decir 1-14, 1-13, 1-12, etc. y 2-15, 3-15, 4-15, etc.) para identificar el epítopo mínimo.

Los presentes inventores han determinado previamente que existe un vínculo entre la capacidad de un péptido para unirse a una molécula de MHC de clase I o II y presentarse a un linfocito T sin el procesamiento adicional del antígeno, y la capacidad del péptido para inducir tolerancia *in vivo* (documento WO 02/16410). Si un péptido es demasiado largo para unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de MHC sin procesamiento adicional (por ejemplo, reducción), o se une en una configuración inapropiada, entonces no será tolerogénico *in vivo*. Si, por otro lado, el péptido es de un tamaño y una configuración adecuados para unirse directamente al surco de unión a péptidos MHC y presentarse a un linfocito T, entonces cabe predecir que este péptido será útil para la inducción de tolerancia.

Por lo tanto, es posible investigar la capacidad tolerogénica de un péptido investigando si puede unirse a una molécula de MHC de clase I o II y presentarse a un linfocito T sin el procesamiento adicional del antígeno *in vitro*.

Los péptidos de la presente invención son epítos (epiTOPOS, independientes del procesamiento antigénico), en tanto en cuanto pueden unirse a una molécula de MHC de clase II y estimular una respuesta a partir de linfocitos T específicos del factor VIII sin el procesamiento adicional del antígeno. Puede predecirse que dichos epítos provocan tolerancia a FVIII, siguiendo el método basado en normas descrito en el documento WO 02/16410.

Un péptido de la presente invención puede ser de cualquier longitud que pueda unirse a una molécula de MHC de clase I o II sin procesamiento adicional. Por lo general, el péptido de la presente invención puede unirse a MHC de clase II.

Los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase I normalmente son de 7 a 13, más habitualmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre átomos de la cadena principal del péptido y sitios invariables del surco de unión a péptidos de todas las moléculas de MHC de clase I. Existen sitios invariables en ambos extremos del surco que se unen a los extremos amino y carboxi del péptido. Se adaptan variaciones de la longitud del péptido mediante un retorcimiento en la estructura principal del péptido, a menudo en los restos de prolina o glicina que permiten la flexibilidad necesaria.

Por lo general, los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase II son de entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más habitualmente de entre 10 y 17 aminoácidos de longitud, y pueden ser más largos (por ejemplo de hasta 40 aminoácidos). Estos péptidos se encuentran en una configuración extendida a lo largo del surco de unión a péptidos de MHC II que (a diferencia del surco de unión a péptidos de MHC de clase I) está abierto en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente mediante contactos de átomos de la cadena principal con restos conservados que revisten el surco de unión a péptidos.

#### SECUENCIAS PEPTÍDICAS

La primera realización de la invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia derivada de FVIII. Las secuencias derivadas de FVIII que se investigaron en los ejemplos tienen las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 1: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID NO: 2: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID NO: 3: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID NO: 4: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID NO: 5: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID NO: 6: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID NO: 7: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID NO: 8: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID NO: 9: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID NO: 10: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

5 SEQ ID NO: 11: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID NO: 12: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

10 SEQ ID NO: 13: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID NO: 14: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID NO: 15: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

15 SEQ ID NO: 16: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID NO: 17: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

20 SEQ ID NO: 18: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

SEQ ID NO: 19: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

SEQ ID NO: 20: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

25 SEQ ID NO: 21: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

SEQ ID NO: 22: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

30 SEQ ID NO: 23: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

SEQ ID NO: 24: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

SEQ ID NO: 25: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

35 SEQ ID NO: 26: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

SEQ ID NO: 27: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

40 SEQ ID NO: 28: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

SEQ ID NO: 29: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

SEQ ID NO: 30: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

45 SEQ ID NO: 31: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys.

SEQ ID NO: 32: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu.

50 El término "tiene" o la expresión "que tiene" pretenden significar que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos dada.

La presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia DNIMVTFRNQASRPY y tiene una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 17, 18, 19, 25, 26, 27, 29, 30 o 31.

55 El péptido puede tener una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 17, 18, 25 o 26.

El péptido puede tener la SEQ ID NO: 17 o 18.

El péptido puede tener la SEQ ID NO: 17.

60 La presente invención también proporciona un péptido que comprende la secuencia PRCLTRYSSFFVNME y tiene una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11 o 13.

El péptido puede tener una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 2, 9 o 10.

65 El péptido puede tener la SEQ ID NO: 1 o 2.



El péptido puede tener la SEQ ID NO: 1.

#### FACTOR VIII

5 Las secuencias DNIMVTFRNQASRPY y PRCLTRYSSFVNME, que forman la parte central de los péptidos de la invención, pueden ambas derivarse del factor VIII.

El factor VIII participa en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea; el factor VIII es un cofactor para el factor IXa que, en presencia de  $Ca^{+2}$  y fosfolípidos, convierte el factor X en la forma activada Xa.

10 El gen del factor VIII produce dos transcripciones sometidos a corte y empalme alternativamente. La variante de transcripción 1 codifica para una gran glicoproteína, la isoforma a, que circula en plasma y se asocia con el factor de von Willebrand en un complejo no covalente. Esta proteína se somete a múltiples escisiones. La variante de transcripción 2 codifica una supuesta proteína pequeña, la isoforma b, que consiste principalmente en el dominio de unión a fosfolípidos del factor VIIIc. Este dominio de unión es esencial para la actividad coagulante.

15 La secuencia completa de 186.000 pares de bases del gen del factor VIII humano se dilucidó a mediados de los años 80 del siglo pasado (Gitschier *et al* (1984) *Nature* 312, 326-330). Al mismo tiempo se usaron clones de ADN codificantes de la secuencia completa de 2.351 aminoácidos para producir el factor VIII biológicamente activo en células de mamífero cultivadas (Wood *et al.*, (1984) *Nature* 312:330-337). La secuencia completa de 2.351 aminoácidos para el factor VIII humano se da en SEQ ID NO: 33.

#### SOLUBILIDAD

25 El péptido de la primera realización de la invención es una forma modificada de uno de los siguientes péptidos:

DNIMVTFRNQASRPY
PRCLTRYSSFVNME

Se ha demostrado que estos péptidos actúan como epítomos y son tolerogénicos *in vivo* (véanse los ejemplos y la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2008/003996).

30 Desde entonces, ha salido a la luz que la solubilidad es una consideración importante en la inducción de tolerancia mediada por péptidos.

35 Los presentes inventores han encontrado que la solubilidad puede mejorarse mediante la incorporación de un espaciador de glicina en ambos extremos, seguida de combinaciones de dos aminoácidos adicionales que pueden ser lisina (K) y/o ácido glutámico (E) tanto en el extremo N como C. La combinación posible en un extremo dado es, por tanto, KK, KE, EK o EE.

40 Por lo tanto, los péptidos modificados de la presente invención tienen 6 aminoácidos más (3 en cada extremo) que los péptidos DNIMV y PRCLT precursores.

Los péptidos de la presente invención tienen la fórmula general:

45 XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX o  
XXGPRCLTRYSSFVNMEGXX

en la que X es bien lisina o ácido glutámico.

50 El péptido modificado puede ser más soluble que el péptido precursor (no modificado). El péptido modificado puede tener una solubilidad de 2, 3, 4 o 5 veces superior que el péptido precursor. El péptido puede ser soluble a concentraciones de hasta 0,5 mg/ml, 1 mg/ml o 5 mg/ml.

#### TOLERANCIA

55 Los epítomos de linfocitos T desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria adaptativa frente a cualquier antígeno, ya sea propio o foráneo. El papel fundamental desempeñado por los epítomos de linfocitos T en las enfermedades de hipersensibilidad (que incluyen alergia, enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplantes) se ha demostrado a través del uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante la inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de los epítomos de linfocitos T) en combinación con adyuvante.

60 Por el contrario, se ha mostrado que es posible inducir la tolerancia inmunológica hacia determinados antígenos mediante la administración de epítomos peptídicos en forma soluble. La administración de antígenos peptídicos

solubles ha demostrado ser un medio eficaz de inhibición de la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE – un modelo de esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5: 1159-1165; Liu y Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7: 1255-1263; Anderton y Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes y uveoretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). Esto también se ha demostrado como medio de tratamiento de una enfermedad en curso en la EAE (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente).

La tolerancia es la ausencia de respuesta frente a un antígeno. La tolerancia a antígenos propios es una característica esencial del sistema inmunitario. Cuando esta se pierde, puede producirse una enfermedad autoinmunitaria. El sistema inmunitario adaptativo debe mantener la capacidad para responder a una enorme variedad de agentes infecciosos, evitando a la vez el ataque autoinmunitario de los antígenos propios contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto se controla en gran medida por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los antígenos propios se detectan en el timo, de modo que la muerte de los timocitos autorreactivos sigue siendo incompleta. Por lo tanto, también existen mecanismos mediante los que puede adquirirse tolerancia por los linfocitos T autorreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). Se facilita una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica en Anderton *et al.*, (1999) (*Immunological Reviews* 169: 123-137).

En la hemofilia A, los pacientes tienen un defecto en el gen del factor VIII. Esto significa que el factor VIII no se reconoce como un antígeno "propio" por el sistema inmunitario. Por lo tanto, cuando se administra factor VIII durante la terapia de reemplazo de factores de coagulación, se genera una respuesta aloinmunitaria hacia la proteína foránea, que conduce a la producción de anticuerpos inhibidores de FVIII.

Los péptidos de la presente invención pueden inducir tolerancia hacia el factor VIII de manera que cuando se administre FVIII profilácticamente, no se induzca una respuesta inmunitaria ni se desarrollen inhibidores de FVIII; y cuando se administre terapéuticamente, se reduzca o se inhiba la producción de inhibidor de FVIII en curso.

La hemofilia adquirida es una enfermedad autoinmunitaria en la que falla la tolerancia al factor VIII. En este caso, se pueden administrar péptidos de la presente invención para reinstaurar la tolerancia a esta proteína propia y restringir la respuesta inmunitaria patógena.

La tolerancia puede deberse a o caracterizarse por la inducción de anergia en al menos una parte de los linfocitos T CD4+. Para activar un linfocito T, un péptido debe asociarse con una APC "profesional" que pueda suministrar dos señales a los linfocitos T. La primera señal (señal 1) es enviada por el complejo MHC-péptido de la superficie celular de la APC y es recibida por el linfocito T a través del TCR. La segunda señal (señal 2) es enviada por moléculas coestimulantes de la superficie de la APC, tales como CD80 y CD86, y es recibida por CD28 en la superficie del linfocito T. Se cree que cuando un linfocito T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no se activa y, de hecho, se vuelve anérgico. Los linfocitos T anérgicos no responden a una exposición antigénica posterior, y pueden suprimir otras respuestas inmunitarias. Se cree que los linfocitos T anérgicos participan en la mediación de la tolerancia de los linfocitos T.

Sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores predicen que los péptidos que requieren procesamiento antes de poderse presentar junto con moléculas de MHC no inducen tolerancia, porque tienen que ser manejados por células presentadoras de antígeno maduras. Las células presentadoras de antígeno maduras (tales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas) pueden procesar antígenos, pero también enviar ambas señales 1 y 2 a un linfocito T, lo que conduce a la activación de los linfocitos T. Los epítomos, por otro lado, podrán unirse a MHC de clase II en APC inmaduras. Por lo tanto, se presentarán a linfocitos T sin coestimulación, lo que conduce a tolerancia y anergia de linfocitos T.

Como es evidente, los epítomos también pueden unirse a moléculas de MHC en la superficie celular de las APC maduras. Sin embargo, el sistema inmunitario contiene una mayor abundancia de APC inmaduras que maduras (se ha sugerido que menos del 10 % de las células dendríticas se activan, Summers *et al.* (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). Por lo tanto, la posición por defecto hacia un epítomo será de anergia/tolerancia, más que de activación.

La inducción de tolerancia a FVIII puede controlarse *in vivo* examinando una reducción en el nivel de:

- (i) anticuerpos inhibidores de FVIII;
- (ii) linfocitos T CD4+ específicos de FVIII;
- (iii) linfocitos B que pueden secretar anticuerpos inhibidores de FVIII mediante técnicas conocidas en la materia.

Por lo tanto, la inducción de la tolerancia también puede controlarse mediante diversas técnicas, entre las que se incluyen:

- (a) la inducción de anergia en los linfocitos T CD4+ (que puede detectarse mediante la posterior exposición a FVIII *in vitro*);

(b) cambios en la población de linfocitos T CD4+, incluyendo:

- (i) reducción de la proliferación;
- (ii) regulación negativa en la producción de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4; e
- (iii) aumento en la producción de IL-10.

Como se usa en el presente documento, el término "tolerogénico" significa que puede inducir tolerancia.

#### COMPOSICIÓN

La presente invención también se refiere a una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende uno o más péptidos de acuerdo con la invención.

La composición puede comprender una forma modificada del péptido DNIMVTFRNQASRPY y una forma modificada del péptido PRCLTRYSSFVNME.

El péptido puede comprender una pluralidad de péptidos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis péptidos.

La composición de la presente invención puede ser para uso profiláctico o terapéutico.

Cuando se administra para uso profiláctico, la composición puede reducir o prevenir la generación de una respuesta inmunitaria hacia FVIII. El nivel de respuesta inmunitaria es inferior al que se habría obtenido en el paciente si no se hubiera tratado con la composición. El término "reducir" indica que se observa una reducción parcial en la respuesta inmunitaria, tal como una reducción del 50 %, 70 %, 80 % o 90 % en la respuesta en comparación con la que se habría observado en el paciente si no se hubiera tratado con la composición (o en la respuesta observada en un paciente no tratado a lo largo del mismo periodo de tiempo). El término "prevenir" indica que no se observa una respuesta inmunitaria apreciable hacia FVIII.

Cuando se administra para un uso terapéutico, la composición puede suprimir una respuesta inmunitaria ya en curso hacia FVIII. El término "suprimir" indica una reducción en el nivel de una respuesta inmunitaria en curso, en comparación con el nivel previo al tratamiento con el péptido, o el nivel que se habría observado en el mismo momento si no se hubiera administrado el tratamiento.

El tratamiento con la composición de la presente invención puede producir una reducción en los niveles de cualquiera o de todos de los siguientes:

- (i) anticuerpos inhibidores de FVIII;
- (ii) linfocitos T CD4+ específicos de FVIII;
- (iii) linfocitos B secretores de anticuerpos inhibidores de FVIII.

La detección de todos estos factores puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas en la materia, tales como ELISA, citometría de flujo, ensayo de coagulación cromogénico, etc.

Además, o como alternativa, el tratamiento con la composición de la presente invención puede producir anergia en los linfocitos T CD4+ específicos de FVIII. La anergia puede detectarse, por ejemplo, mediante la posterior exposición a FVIII *in vitro*.

Es importante tener en cuenta que no todas las respuestas inmunitarias frente a FVIII son patógenas. Pueden encontrarse anticuerpos anti-FVIII no inhibidores en pacientes con hemofilia sin inhibidores (Moreau *et al.*, (2000) "Blood" 95:3435-41) y aproximadamente el 15 % de los donantes de sangre sanos (Algiman *et al.*, (1992) 89:3795-9).

Pueden detectarse los inhibidores de FVIII mediante la modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda de coagulación, en el que se ensaya la capacidad del plasma del paciente para inactivar FVIII en plasma normal. Una unidad Bethesda se define como la cantidad de anticuerpo que neutraliza el 50 % de la actividad de FVIII en plasma, y los títulos de 0,6 UB o superiores sugieren la presencia de anticuerpo.

En general, los inhibidores se clasifican como de bajo título si el nivel es < 5 UB y de alto título si es  $\geq$  5 UB.

El nivel de anticuerpos inhibidores contra FVIII circulantes puede reducirse hasta el 90 %, 75 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 % del nivel de anticuerpos en comparación con el que se habría observado si el paciente no hubiera recibido tratamiento.

El nivel de anticuerpos inhibidores contra FVIII circulantes puede reducirse hasta 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5 UB.

Los péptidos y la composición de la invención pueden aumentar la cantidad o la proporción de FVIII administrado terapéuticamente que está disponible para ayudar en la coagulación en un paciente. Esto se debe a la reducción de los inhibidores de FVIII que pueden evitar eficazmente que una proporción de FVIII ejerza su función terapéutica. El péptido o la composición de la invención pueden aumentar la cantidad de FVIII disponible en, por ejemplo, el 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %.

Por lo tanto, los péptidos y la composición de la invención pueden reducir la cantidad de FVIII que es necesario administrar para ayudar en la coagulación en un paciente.

## 10 FORMULACIÓN

La composición puede prepararse como un inyectable, bien como una suspensión o como una solución líquida. También puede prepararse una forma sólida adecuada para la disolución o la suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o los péptidos encapsularse en liposomas. Los principios activos pueden mezclarse con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol o similar y combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y/o agentes tamponantes del pH. Las sales tamponantes incluyen fosfato, citrato, acetato. Se puede usar ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio para el ajuste del pH. Para la estabilización, pueden usarse disacáridos tales como sacarosa o trehalosa.

Si la composición comprende una pluralidad de péptidos, la proporción relativa de los péptidos puede ser aproximadamente igual. Como alternativa, las proporciones relativas de cada péptido pueden alterarse, por ejemplo, para centrar la respuesta tolerogénica en un determinado subconjunto de linfocitos T autorreactivos o si resulta que un péptido funciona mejor que los otros en determinados tipos de HLA.

Tras la formulación, la composición puede incorporarse a un recipiente estéril que luego se sella y se almacena a baja temperatura, por ejemplo, a 4 °C, o puede criodesecarse.

De manera conveniente, se prepara la composición en forma de un polvo liofilizado (criodesecado). La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo de forma estabilizada. En la materia, se conocen bien procedimientos de liofilización, véase, por ejemplo, <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Comúnmente, se usan agentes formadores de volumen antes de la criodesecación, tales como manitol, dextrano o glicina.

La composición puede administrarse de manera conveniente tal como por las vías oral, intravenosa (cuando es hidrosoluble), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o como supositorio, o mediante implantes (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta).

La composición puede administrarse ventajosamente por las vías intranasal, subcutánea o intradérmica.

El péptido y la composición de la invención pueden usarse para tratar un sujeto humano. El sujeto puede tener hemofilia A, en particular, hemofilia A grave. El sujeto puede ser genéticamente deficiente en FVIII. El sujeto puede tener hemofilia adquirida. El sujeto puede tener anticuerpos anti-FVIII inhibidores.

El sujeto puede estar sometiéndose o estar a punto de someterse a terapia de reemplazo coagulante con FVIII.

El sujeto puede estar sometiéndose o estar a punto de someterse a terapia con agentes antihemorrágicos (con o sin terapia de reemplazo coagulante con FVIII).

El sujeto puede estar sometiéndose o estar a punto de someterse a terapia génica con el gen de FVIII.

El sujeto puede tener un haplotipo HLA que se asocia con una predisposición a desarrollar autoanticuerpos o autoanticuerpos anti-FVIII inhibidores. El sujeto puede expresar HLA-DR2. En la materia, se conocen métodos para determinar el haplotipo HLA de un individuo.

Por lo general, un médico determinará la dosis exacta que será la más adecuada para cada sujeto y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular.

En una realización preferida, puede seguirse un protocolo de "ajuste de la dosis", en el que se administre al paciente una pluralidad de dosis en concentraciones ascendentes. Dicha metodología se ha usado, por ejemplo, para péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia al veneno de abejas (Müller *et al* (1998) *J. Allergy Clin Immunol.* 101:747-754 y Akdis *et al.*, (1998) *J. Clin. Invest.* 102:98-106).

## KITS

De manera conveniente, si la composición comprende una pluralidad de péptidos, pueden administrarse juntos, en forma de una composición mixta o cóctel. Sin embargo, puede haber circunstancias en las que sea preferible proporcionar los péptidos por separado en forma de un kit, para la administración simultánea, separada, secuencial o combinada.

El kit también puede comprender medios de mezclado y/o administración (por ejemplo, un vaporizador para la administración intranasal; o una jeringuilla y aguja para la dosificación subcutánea/intradérmica). El kit también puede comprender instrucciones para su uso.

La composición farmacéutica o el kit de la invención se pueden usar para tratar y/o prevenir una enfermedad.

En particular, la composición/el kit se pueden usar para tratar y/o prevenir la formación de inhibidor anti-FVIII en pacientes con hemofilia A o hemofilia adquirida. La composición/el kit se pueden usar para tratar la hemofilia afectada por la presencia de anticuerpos FVIII neutralizantes.

## HEMOFILIA A

La hemofilia A (hemofilia clásica) está provocada por la deficiencia del factor VIII.

La hemofilia A tiene una incidencia estimada de 1 de cada 10.000 varones, mientras que se estima que la hemofilia B se da en uno de cada 40.000 varones. Aproximadamente 1 mujer de cada 5.000 es portadora de la hemofilia A, y 1 de cada 20.000 es portadora de la hemofilia B.

La hemofilia normalmente se divide en tres clases: grave, moderada y leve, basándose en el nivel del factor de coagulación en la sangre. En la hemofilia grave, existe menos del 1 por ciento de factor de coagulación normal. El grado de gravedad tiende a ser constante de una generación a otra.

En contra de la creencia popular, los cortes y las heridas menores no suelen representar una amenaza para las personas hemofílicas. En cambio, el mayor peligro procede de hemorragia espontánea que puede producirse en las articulaciones y en los músculos. Hay mayor probabilidad de que se produzca durante los años de crecimiento rápido, normalmente entre las edades de los 5 y los 15 años.

La hemorragia espontánea repetida en las articulaciones puede producir artritis, y se debilitan los músculos adyacentes. La presión sobre los nervios producida por la acumulación de sangre puede generar dolor, entumecimiento e incapacidad temporal para mover la zona afectada.

La hemofilia A se suele diagnosticar con un análisis de sangre para determinar la eficacia de la coagulación y para examinar si los niveles de factores de coagulación son anómalos.

El desarrollo de factores de coagulación purificados en los años 70 del siglo pasado, aislados de sangre de donantes, mejoró significativamente las perspectivas a largo plazo para las personas hemofílicas. Las personas con hemofilia de leve a moderada pueden usar el tratamiento con FVIII según sus necesidades, mientras que las personas con hemofilia grave pueden requerir tratamiento regular, indefinido.

Previamente, los pacientes recibían concentrados de factor VIII combinados de miles de donaciones de plasma. Esto conduce a importantes problemas de contaminación con patógenos virales, en particular, con el virus de la inmunodeficiencia humana y los virus de la hepatitis. Las técnicas de purificación de anticuerpos monoclonales, la inactivación por calor y el tratamiento con detergentes virucidas han hecho que los concentrados derivados de plasma sean relativamente seguros.

La tecnología de ADN recombinante ha proporcionado ahora una serie de productos sintéticos, tales como Recombinate™ y Kogenate™. Kogenate se prepara usando células de riñón de hámster neonato que expresan el factor VIII humano. El factor resultante está altamente purificado, eliminando cualquier posibilidad de transmisión de virus desde el plasma.

El péptido o la composición de la presente invención se pueden administrar antes y/o durante la terapia de reemplazo de factor VIII.

La hemofilia A es una enfermedad diana ideal para la terapia génica, dado que i) está causada por mutaciones en un solo gen identificado; ii) un ligero aumento en los niveles de factor de coagulación *in vivo* puede convertir una hemofilia grave en una enfermedad más leve; e iii) las terapias de reemplazo actuales se consideran subóptimas. Además, existe un amplio intervalo de seguridad si existe una "superación" del nivel deseado de actividad de coagulación.

Desafortunadamente, hasta la fecha, no se ha cumplido la promesa de la terapia génica como cura para la hemofilia, principalmente debido a dificultades para encontrar un sistema de administración de genes que sea lo suficientemente no inmunogénico para permitir la expresión a largo plazo del factor de coagulación.

5 Los péptidos de la presente invención también serán adecuados para inducir tolerancia en un sujeto antes de la terapia génica con factor VIII y/o tratar la formación de inhibidores de FVIII en un paciente tras la terapia génica.

#### HEMOFILIA ADQUIRIDA

10 La hemofilia adquirida se caracteriza por la presencia de inhibidores de autoanticuerpo contra FVIII en individuos con coagulación previamente normal. Se trata de una afección rara, con una incidencia estimada de 1-3 por población de 1 millón de personas al año. La tasa de mortalidad asociada con los inhibidores de autoanticuerpos adquiridos se aproxima al 25 % frente al riesgo de mortalidad esencialmente inferior en aquellos con aloanticuerpos.

15 En comparación con los pacientes con inhibidores de aloanticuerpos, la hemofilia adquirida se caracteriza por: (1) un patrón de hemorragia más grave; (2) mayor incidencia en la población anciana; (3) aparición junto con enfermedades autoinmunitarias subyacentes identificables, cánceres linfoproliferativos o por tumores sólidos, embarazo y uso de determinados antibióticos tales como penicilina y sulfonamidas en aproximadamente el 50 % de los casos; y (4) actividad inhibidora *in vitro* que sigue un patrón farmacocinético de tipo II con neutralización incompleta de la actividad del factor de coagulación diana por el autoanticuerpo, normalmente produciendo niveles residuales de factor VIII que varían entre el 2 % y el 18 % en el plasma del paciente.

20 El péptido o la composición de la presente invención se pueden administrar a un paciente con hemofilia adquirida o a un paciente que se cree que corre el riesgo de desarrollar hemofilia adquirida debido a, por ejemplo:

- 25
- i) tratamiento inminente con, por ejemplo, penicilina o una sulfonamida;
  - ii) progresión de un tumor u otro trastorno maligno;
  - iii) embarazo inminente o recién iniciado.

30 La invención se describirá ahora además por medio de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto habitual en la materia a llevar a cabo la invención, y no pretenden, bajo ningún concepto, limitar el alcance de la invención.

#### Ejemplos

##### 35 Ejemplo 1: Examen de la solubilidad de los péptidos derivados de FVIII

Se ensayó un total de 32 péptidos: 16 de los cuales se basaban en el péptido de FVIII PRCLTRYSSFNME ("PRCLT"); y 16 de los cuales se basaban en el péptido FVIII DNIMVTFRNQASRPY ("DNIMV"). Los péptidos se resumen en las siguientes Tablas 1 y 2.

40 Tabla 1 - Péptidos derivados de PRCLT

Péptido n.º	Secuencia	SEQ ID NO:
1	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	1
2	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	2
3	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	3
4	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	4

ES 2 626 881 T3

Péptido n.º	Secuencia	SEQ ID NO:
5	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	5
6	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	6
7	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	7
8	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	8
9	Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	9
10	Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	10
11	Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	11
12	Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	12
13	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	13
14	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	14
15	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	15
16	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	16

Tabla 2 - Péptidos derivados de DNIMV

Péptido n.º	Secuencia	SEQ ID NO:
17	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	17
18	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	18
19	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	19
20	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	20
21	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	21
22	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	22
23	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	23
24	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	24
25	Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	25
26	Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	26
27	Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	27
28	Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	28



Péptido n.º	Secuencia	SEQ ID NO:
29	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	29
30	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	30
31	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	31
32	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	32

Se preparó una solución madre de cada péptido de ensayo de 20 mg/ml en DMSO. También se preparó una solución madre del péptido de control, un péptido derivado de MBP conocido como 4Y, en DMSO. El péptido 4Y tiene la secuencia Ac-ASQYRPSQR. Es estructuralmente desigual a los péptidos de ensayo, pero se sabe que es suficientemente soluble para su aplicación como antígeno tolerante.

Se prepararon diluciones secuenciales de un volumen de 40 µl de solución de péptido añadiendo agua a una placa de 96 pocillos para dar concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1,25 mg/ml.

Se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir que se formara cualquier precipitado y luego se centrifugaron a 14.800 rpm durante 10 minutos para separar el péptido precipitado/coloidal del soluto verdaderamente disuelto.

Se retiró una muestra de 2 µl de la parte superior de cada tubo para su análisis. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y se calculó la concentración (mg/ml).

Los resultados se muestran en la Figura 1. Algunos péptidos marcados demostraron una solubilidad equivalente a 4Y, incluso a alta concentración. Los péptidos codificados en verde eran tan solubles como el péptido de control 4Y, los péptidos codificados en rojo eran poco solubles, y un péptido codificado en ámbar tenía solubilidad intermedia.

#### Ejemplo 2 - Disolución directa de péptidos marcados en disolvente acuoso a concentración clínicamente relevante

Para cada péptido de ensayo y los péptidos precursores (PRCLT y DNIMV), se prepararon dos tubos a 4 mg/ml en DMSO (control) o PBS.

Se centrifugó cada tubo a toda velocidad en una minicentrífugadora durante 5 minutos. Se retiró una muestra de 10 µl de la parte superior de cada solución y se registró el peso molecular y el coeficiente de absorción para cada péptido.

Se midió la absorbancia del sobrenadante usando NanoDrop y se calculó la concentración. Se comparó la concentración real con el valor esperado de 4 mg/ml y los resultados se muestran en la Figura 2. En dicha figura, la mayor disparidad entre la concentración real y la esperada corresponde a una menor solubilidad relativa.

Como se muestra en la Figura 2, todos los péptidos marcados SEQ ID NO: 1, 2, 9, 10, 17, 18, 25 y 26 resultaron tener una solubilidad mejorada en PBS en comparación con los péptidos precursores.

#### Ejemplo 3: Los péptidos marcados actúan como epítomos

Se estimularon ratones transgénicos HLA-DR2 con los péptidos precursores PRCLT o DNIMV. A continuación, se recogieron los bazo y los ganglios linfáticos, y tras la purificación con CD4, se volvieron a estimular las células con 1 µg/ml de FVIII recombinante humano. Tras la fusión con las células BW5147, se expandieron los clones resultantes y se "exploraron" para determinar la especificidad por DNIMV o PRCLT. Esto se realiza incubando células de hibridoma con  $5 \times 10^4$  células presentadoras de antígeno positivas en DR2 (línea celular MGAR) y 10 µg/ml de PRCLT/DNIMV o medio durante 48 horas. A continuación, se analizaron los sobrenadantes para determinar la producción de IL-2 mediante ELISA.

Se expandieron los clones que produjeron IL-2 específicamente cuando se incubaron con péptido y se exploraron de nuevo con FVIII (a 1 ug/ml).

5 A continuación, se usaron los clones que produjeron IL-2 en respuesta tanto a FVIII como al péptido para evaluar si los péptidos modificados de DNIMV y PRCLT son epítomos, es decir, si son capaces de unirse a una molécula de MHC y ser presentados a un linfocito T por parte de APC tanto fijas como recién preparadas.

10 Se incubaron  $5 \times 10^4$  células de hibridoma con  $5 \times 10^4$  células MGAR recién preparadas o fijas, y 10 ug/ml de péptido, 1 ug/ml de FVIII o medio durante 48 horas. A continuación, se analizaron los sobrenadantes para determinar la IL-2 usando ELISA. Los resultados se muestran para PRCLT en la Figura 3a y para DNIMV en la Figura 3b.

15 Todos los péptidos marcados fueron capaces de ser presentados por células presentadoras de antígeno fijas, lo que indica que son todos epítomos como los péptidos precursores PRCLT y DNIMV.

#### Ejemplo 4: Tolerancia de linfocitos T ex vivo

20 Para determinar si los epítomos modificados eran capaces de regular las respuestas de los linfocitos T a péptidos precursores, se trataron ratones transgénicos HLA-DR2 macho con  $3 \times 100 \mu\text{g}$  de péptido (péptidos SEC ID NO: 1, 2, 17 o 18) o PBS como control, y luego se inmunizaron con  $100 \mu\text{g}$  de cada uno de los péptidos precursores (PRCLT y DNIMV) en adyuvante completo de Freund. Diez días más tarde, se extirparon los ganglios linfáticos drenantes y los bazo, y se estimularon *in vitro* con PRCLT o DNIMV. Los resultados se muestran en las Figuras 4 (PRCLT) y 5 (DNIMV). El tratamiento con péptidos modificados SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 reduce las respuestas de los linfocitos T a PRCLT, y el tratamiento con péptidos modificados SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18 reduce las respuestas de los linfocitos T a DNIMV. Así pues, los péptidos modificados son capaces de reducir una respuesta inmune de ratones inmunizados con el péptido precursor.

#### Ejemplo 5: Tolerancia de los linfocitos T ex vivo

30 Para determinar si el efecto de los epítomos modificados sobre la regulación de las respuestas de los linfocitos T a los péptidos precursores se extendía a las respuestas reguladoras hacia FVIII, se trataron ratones transgénicos HLA-DR2 hembras con  $3 \times 100 \mu\text{g}$  de péptido (péptidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 17) y luego se estimularon con  $100 \mu\text{g}$  de cada uno de los péptidos precursores (PRCLT y DNIMV) en adyuvante completo de Freund. Diez días más tarde, se extirparon los ganglios linfáticos drenantes, y se estimularon *in vitro* bien con PRCLT, DNIMV o FVIII recombinante. Los resultados se muestran en la Figura 6. El péptido SEQ ID NO: 1 redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la respuesta de los linfocitos T al péptido PRCLT. El péptido SEQ ID NO: 17 redujo significativamente ( $p < 0,02$ ) la respuesta de los linfocitos T hacia DNIMV.

40 El péptido SEQ ID NO: 1 reguló las respuestas hacia PRCLT y el péptido SEQ ID NO: 17 reguló las respuestas hacia DNIMV. También hubo alguna reducción, que no fue significativa, en respuesta a FVIII con péptidos individuales. Para potenciar la eficacia de los péptidos frente a las respuestas inmunitarias de FVIII, se usó una combinación de DNIMV modificado y PRCLT modificado en experimentos adicionales.

#### Ejemplo 6: Prevención de generación de anticuerpos con un aumento a escala de la dosis de una combinación de péptidos modificados con PRCLT y DNIMV

45 Se trataron ratones transgénicos HLA-DR2 macho con la combinación del péptido SEQ ID NO: 1 y el péptido SEQ ID NO: 17 tras un protocolo de aumento a escala de la dosis. Se administraron seis inyecciones de la combinación a la siguiente dosis: 0,1; 1,0; 10 y  $3 \times 100 \mu\text{g}$  (para cada péptido de la combinación).

50 A continuación, se estimularon los animales semanalmente con  $1 \mu\text{g}$  de FVIII humano recombinante y un tratamiento concurrente (3 días después de la inmunización con rFVIII) con una combinación de péptidos SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 17 ( $100 \mu\text{g}$  de cada uno) y la generación de anticuerpos anti-FVIII analizados de muestras de sangre tomadas después de 4 y 8 inmunizaciones con FVIII (día 28, Figura 7a; día 56, Figura 7b, respectivamente). Se titularon y se analizaron los sueros mediante ELISA directo. El título de anticuerpos para los ratones no inmunizados fue negativo en todos los casos, mientras que el anticuerpo anti-FVIII se consideró presente en el suero de los ratones tratados, donde la relación de unión (usando sueros negativos para calcular la relación) fue superior a 1,9. Los resultados se muestran en la Figura 7 a y b para el día 28 y el día 56 del experimento, respectivamente.

60 Además, se midieron los anticuerpos FVIII neutralizantes el día 56. Los anticuerpos FVIII neutralizantes se determinaron usando un método cromogénico. En resumen, se mezclaron las muestras con 1 UI/ml de FVIII y se inició la coagulación mediante la adición de FIX, FX, trombina,  $\text{CaCl}_2$  y fosfolípidos. Tras la incubación, se determinó la cantidad de FXa generada mediante la adición del sustrato cromogénico S-2760 y se midió la señal de DO. La señal de DO es proporcional a la actividad de FVIII en las muestras, y se compara con muestras que contienen una cantidad conocida de FVIII y sin anticuerpos neutralizantes. Se calculó el % de actividad restante de la muestra de ensayo en comparación con las muestras de referencia y se expresó en unidades de tipo Bethesda, y se muestra en

65

la Figura 8. Los ratones tratados con los péptidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 resultaron tener un nivel significativamente inferior de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes que los ratones tratados con PBS.

5 Ejemplo 7: Tolerancia de los linfocitos T *ex vivo* usando un aumento a escala de la dosis de una combinación de péptidos modificados con PRCLT y DNIMV

Se trataron ratones transgénicos DR2 machos y hembras con la combinación de los péptidos SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 17 tras un protocolo de aumento a escala de la dosis según lo descrito en el Ejemplo 6.

10 Se estimularon los animales con 100 µg de PRCLT y 100 µg de DNIMV en CFA. Diez días más tarde, se aislaron células de ganglios linfáticos drenantes y esplenocitos, y se volvieron a estimular *in vitro* con FVIII recombinante.

15 Se evaluaron las respuestas de los linfocitos T mediante ensayos de proliferación (Figura 9). Se observó una reducción significativa de las respuestas de los linfocitos T a FVIII a través de todas las concentraciones de FVIII ensayadas cuando se trataron los ratones con la combinación de péptidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 8: Supresión de la generación de anticuerpos neutralizantes con un aumento a escala de la dosis de una combinación de péptidos modificados con PRCLT y DNIMV en un modelo terapéutico con animales

20 Se estimularon ratones transgénicos HLA-DR2 con 3 µg de rFVIII en CFA y, tres semanas después de la inmunización, se trataron con la combinación del péptido SEQ ID NO: 1 y el péptido SEQ ID NO: 17 después de un protocolo de aumento a escala de la dosis. Se administraron seis inyecciones de la combinación a la siguiente dosis: 0,1; 1,0; 10 y 3 x 100 µg (para cada péptido de la combinación). Los animales de control se trataron con un péptido 133-152 de fosfatasa de ácido prostático (PAP) de unión a DR2 de FVIII no relacionado (secuencia como se describe en la patente PCT/US2006/031961, SEQ ID NO: 15) usando el mismo protocolo de aumento a escala de la dosis. Todos los animales recibieron una inmunización de refuerzo con 3 µg de rhFVIII en IFA cinco semanas después de la inmunización con rFVIII y 4 días después de la última serie de tratamiento con péptido. Se analizó la generación de anticuerpos neutralizantes de muestras de plasma tomadas 3 semanas después de la primera inmunización con FVIII y antes de cualquier tratamiento con péptido, en la semana 5 (antes de la inmunización de refuerzo de FVIII y después del tratamiento con péptido) y durante un período de seguimiento en la semana 7, 9 y 13. Los niveles de anticuerpos FVIII neutralizantes en las muestras de plasma se determinaron como se describe en el Ejemplo 6.

35 Los resultados de la Figura 10 muestran que el tratamiento con los péptidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 17 tres semanas después de la inmunización con FVIII (Semana 3) suprimen significativamente la formación de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes después de la inmunización de refuerzo (Semana 5) en comparación con el tratamiento con péptido de control.

40 Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, se ha de entender que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son evidentes para los expertos en inmunología molecular o campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

45 SEQ ID NO: 33

1 mqieltstcfff lcllrfcfssa trryylgave lswdymqsdl gelpvdarfp prvpksfpfn  
61 tsvvykktlf veftdhlfni akprppwmgf lgpitqaevy dtvvtlknm ashpvslhav  
121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpq gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh  
181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkshwse tknslmqdrd  
241 aasarawpkm htvngyvnrslpgligchrk svywhvigmg tpevhsifl eghtflvrnh  
301 rqsleispi tftaqtllm dlqgflfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlmknne  
361 eaedydddlt dsemdvvrfd ddnspsfiqi rsvakkhpkv wvhyiaaeeee dwdyaplva  
421 pddrsyksqy lnnqprqr kykkvrfmay tdefktrea iqhesgilgp llygevgdtl  
481 liifknqasr pyniypghit dvrplysrll pkgvkhkdf pilpgeifky kwvtvedgp  
541 tksdprcltr yysfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilsvfde  
601 nrswylteni qrlfnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils  
661 igaqtdflsv ffsygfkhk mvyedtlfl pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrng  
721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknaieprs fsqnsrhpst rqqfnatti  
781 pendiektdp wfahrtmpk iqnvssdill mlrrqsptph glslsdqea kyetsddps  
841 pgaidssnsl semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrlne klgttaatel kklfdkvsst  
901 snnlstips dnlaagdnt sslgppsmv hydsqldtll fgkssplte sggplslsee  
961 nndskllesg lmsqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn  
1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatalrl  
1081 nhmsnktts knmemvqqk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg  
1141 qgppskqlvs lqpeksvevg nlfseknkv vqggefktkv glkemvfpss nrlflnldn  
1201 lhenhthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknfills trqnvegsyd  
1261 gayapvlqdf rslndstnr kkhtahfskk geeenlegl nqtqiveky actrispnt  
1321 sqqnfvtqrs kralkqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke  
1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrsplpia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpasyy  
1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailtle mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp  
1501 kpdlpktskg vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldlv egslqgteg aikwneanrp  
1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl  
1621 nacesnhaia ainegqnke ievtwakqgr terlcsqnpv vlkrhqreit rttlqsdqee  
1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkkrthyfia averlwdygm sssphvlrnr  
1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtrfnqasr  
1801 pysfysllis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv  
1861 dlekdvhsgl igpllvchn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmernra  
1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngymdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsihfsg  
1981 vftvrkkey kmalynlypg vftvemlps kagiwrvecl igeihlagms tflvysnkc  
2041 qtlpimasgh irdfqtasg qyqwapkla rhysgsina wstkepfswi kvdlapmii  
2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn  
2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa  
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvtqgvksl ltsmyvkefl  
2281 issqdghqw tiffqngkvk vfqgnqdsft pvvnslppl ltrylrihpq swvhqialm  
2341 evlgceaql y



6. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para su uso en la supresión o la prevención de la producción de anticuerpos inhibidores del factor VIII *in vivo*.
- 5 7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para su uso en un método de tratamiento de la hemofilia en un sujeto.
8. Un péptido o una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sujeto tiene hemofilia A, y está siendo sometido, o a punto de ser sometido, a una terapia de reemplazo del factor VIII y/o terapia con antihemorrágicos de FVIII.
- 10 9. Un péptido o una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sujeto ha contraído o está en riesgo de contraer hemofilia adquirida.
- 15 10. Un péptido o una composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el sujeto es HLA-DR2.

Figura 1

	PRCLT	DNIMV	
KK-KK	1	2	Investigación adicional
KK-KE	2	19	
KK-EK	3	25	
KK-EE	4	20	
EE-KK	5	21	Investigación adicional
EE-KE	6	7	
EE-EK	7	28	
EE-EE	8	26	
KE-KK	9	8	
KE-KE	10	7	
KE-EK	11	9	
KE-EE	12	29	
EK-KK	13	20	
EK-KE	14	16	
EK-EK	15	4	
EK-EE	16	27	

Figura 2

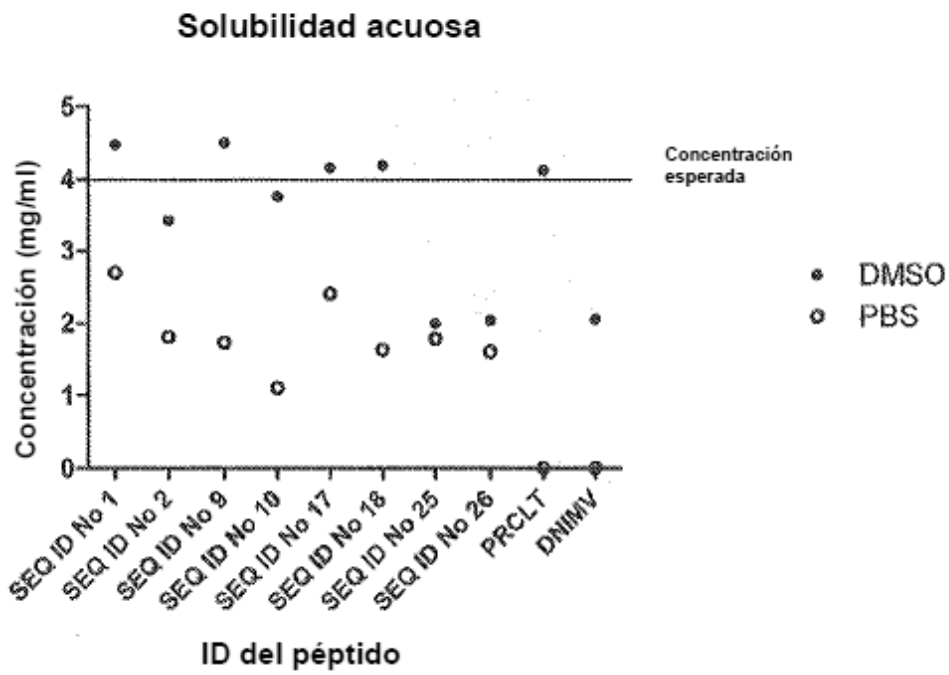


Figura 3a

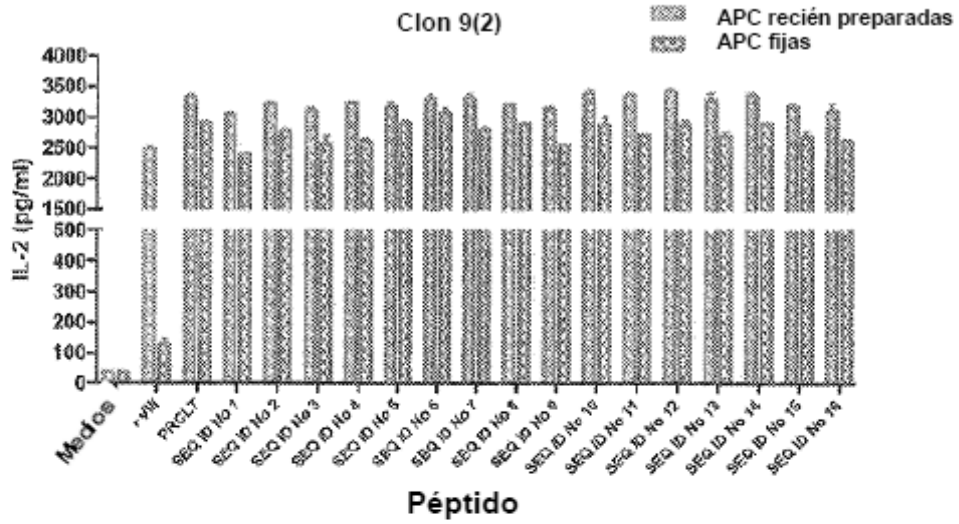


Figura 3b

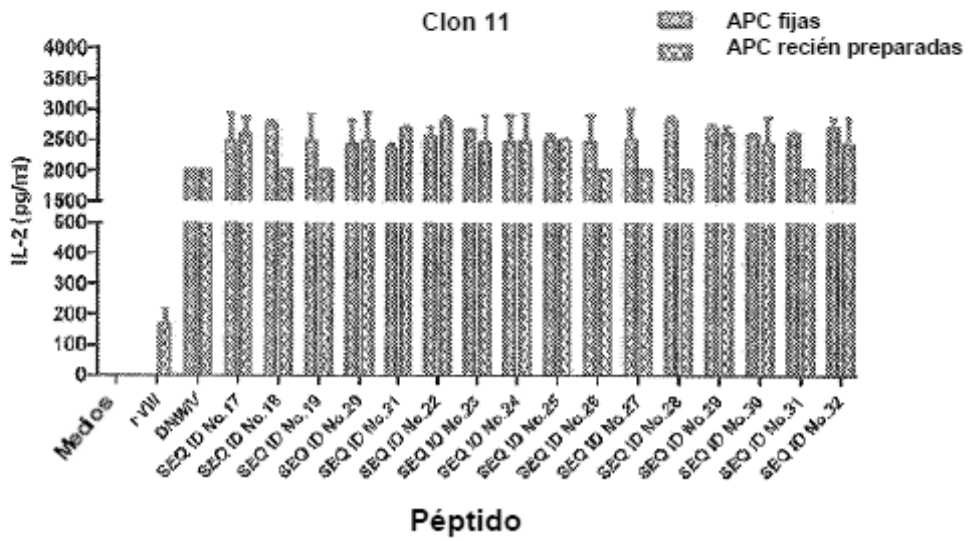




Figura 4

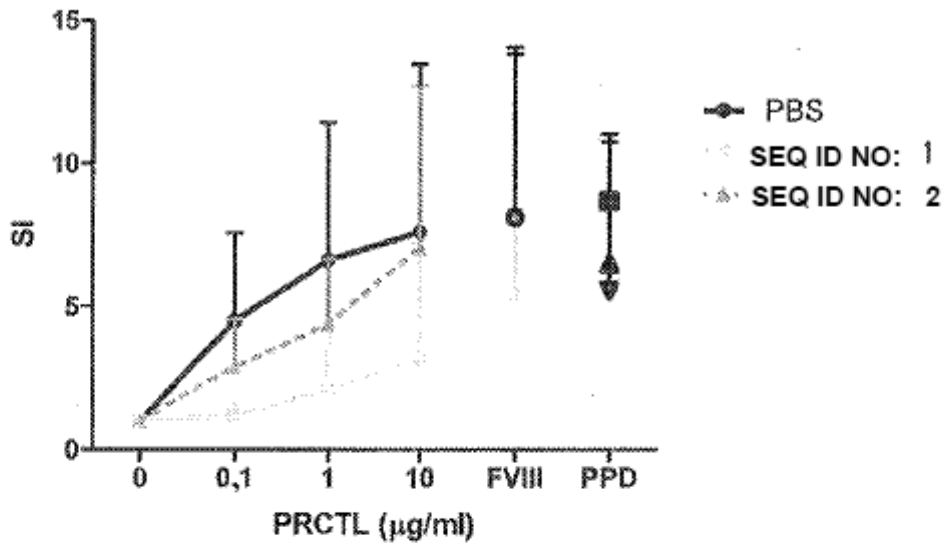


Figura 5

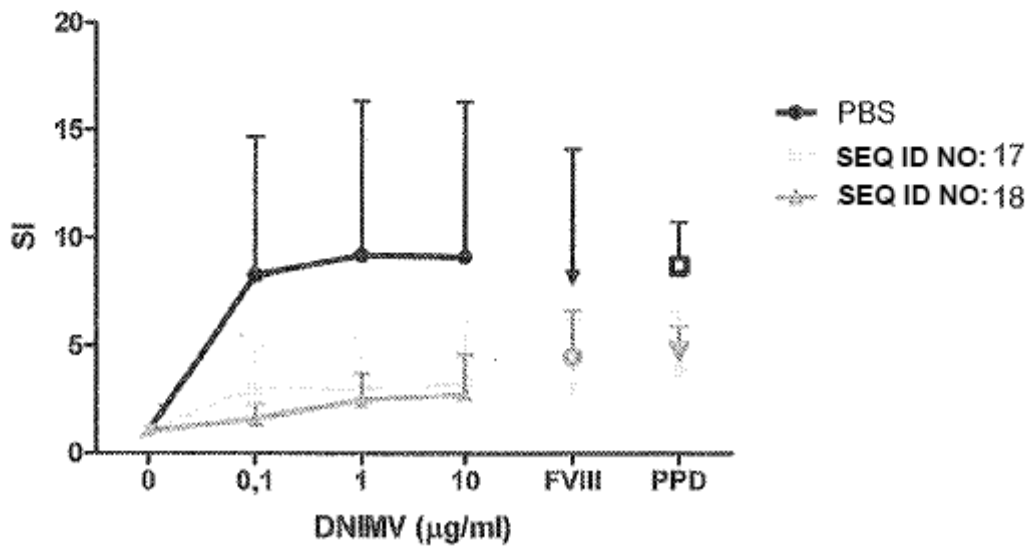


Figura 6

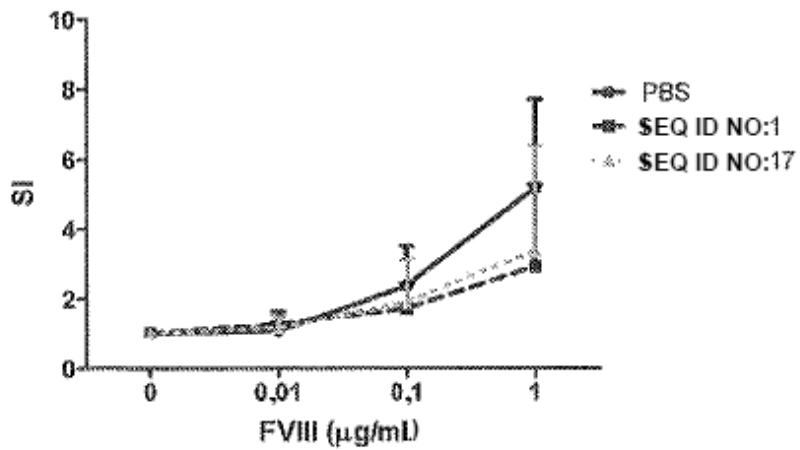
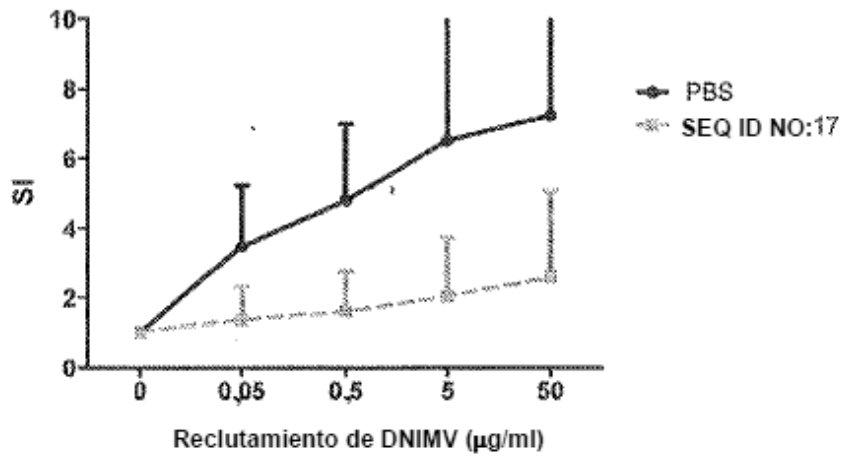
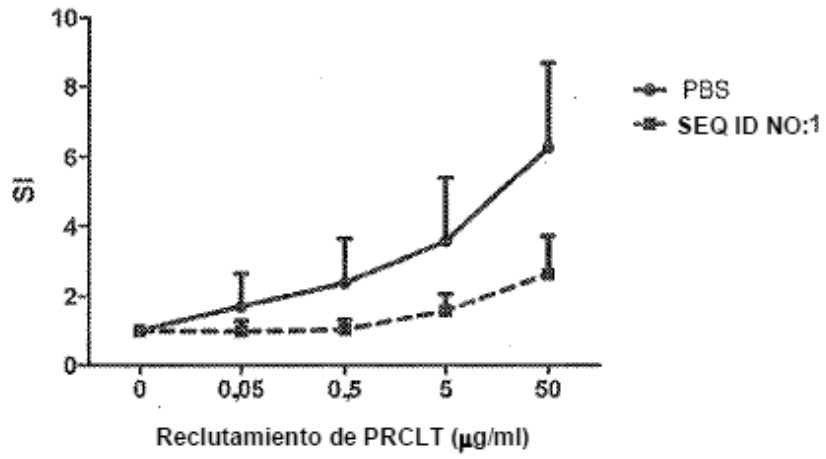


Figura 7

Figura 7a: Títulos de anticuerpo anti-FVIII del día 28:

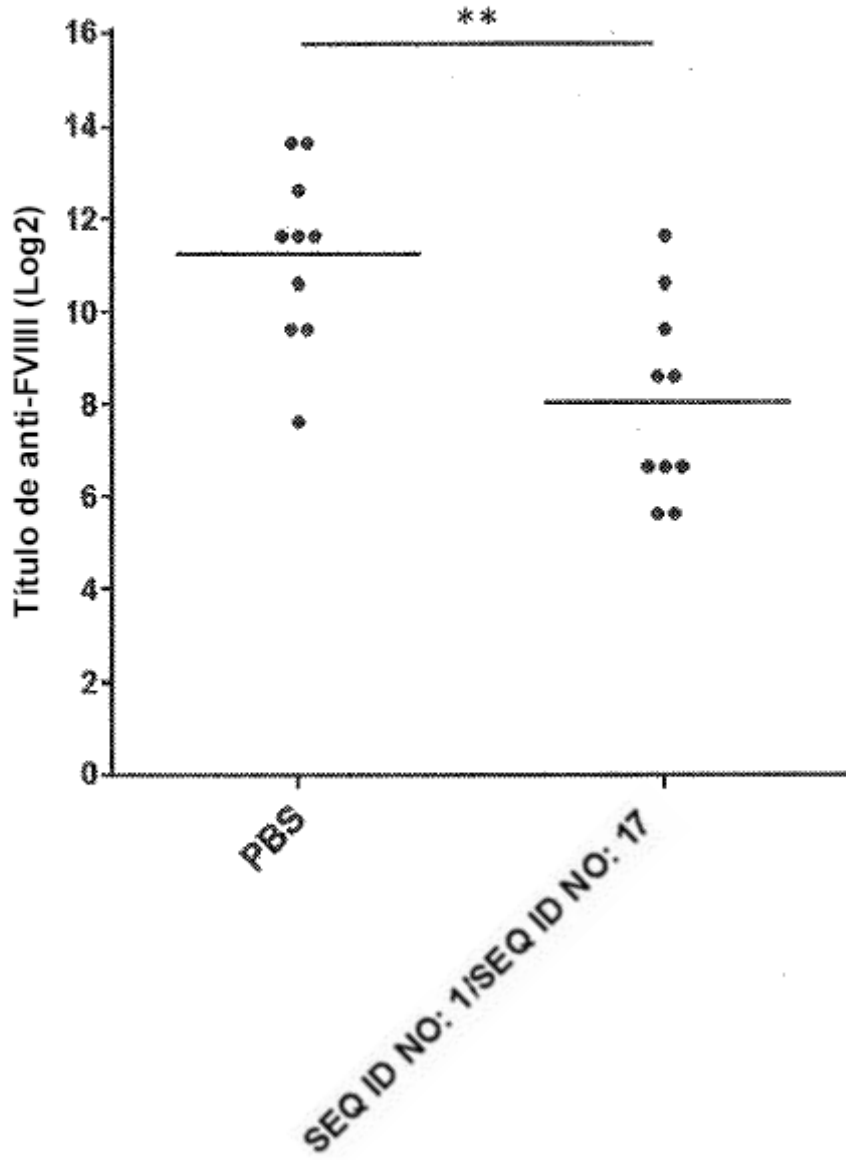


Figura 7b: Títulos de anticuerpo anti-FVIII del día 56:

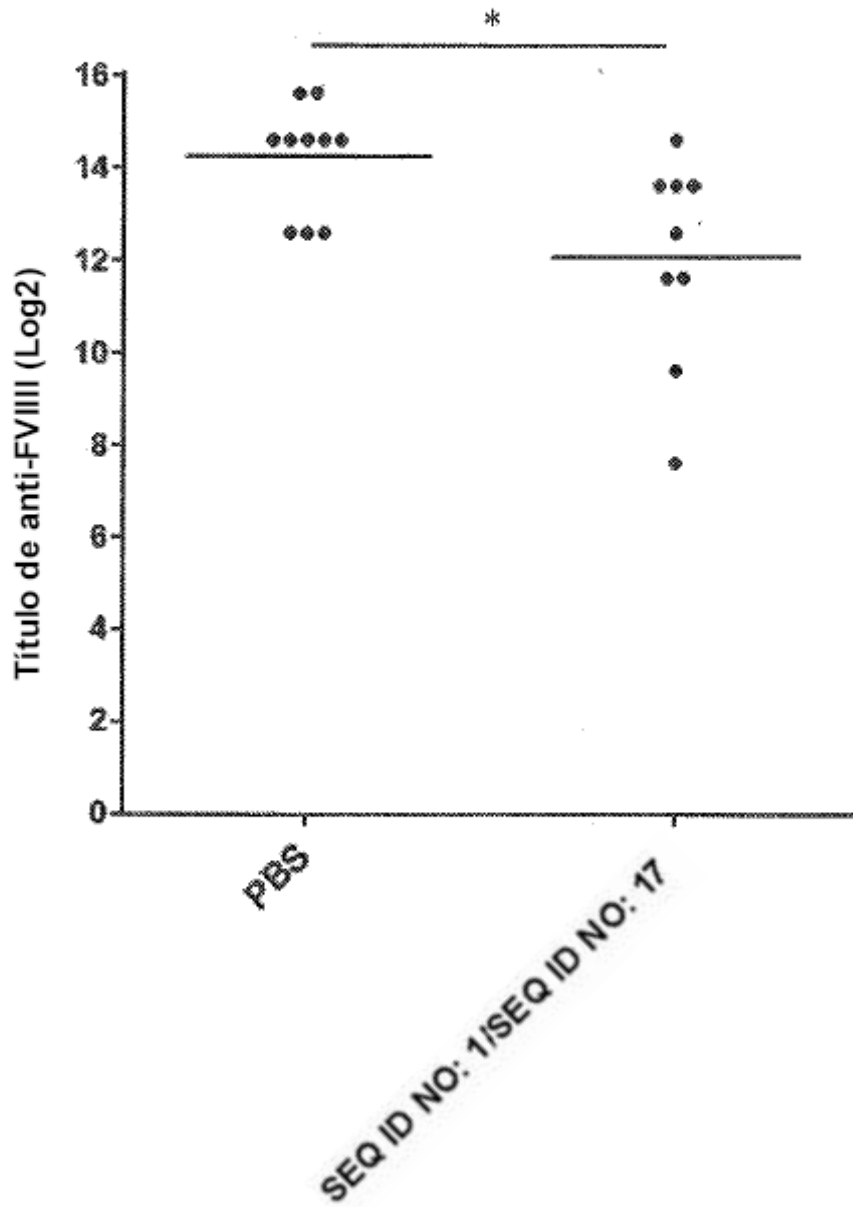


Figura 8

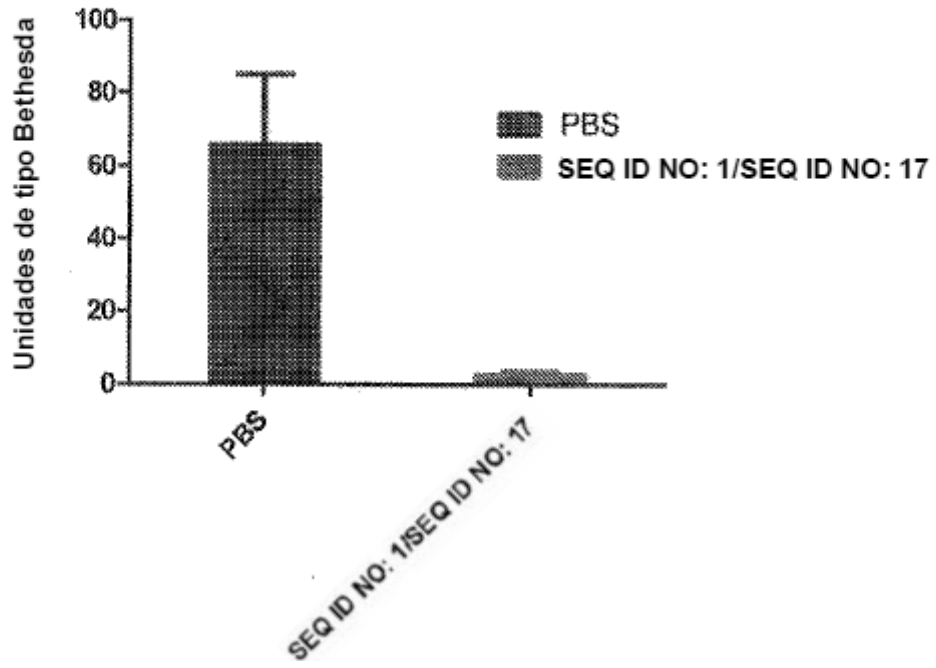
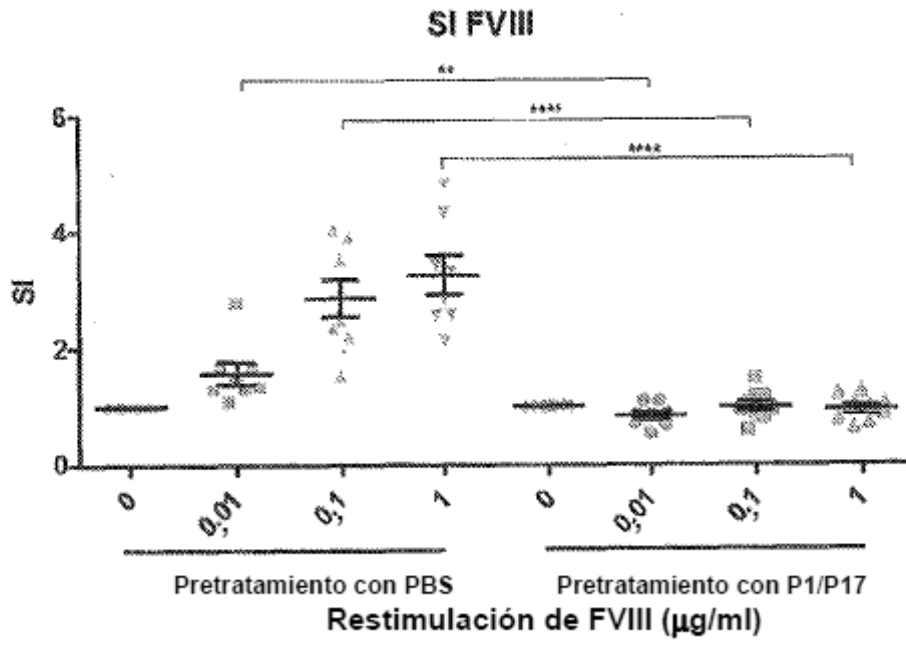


Figura 9



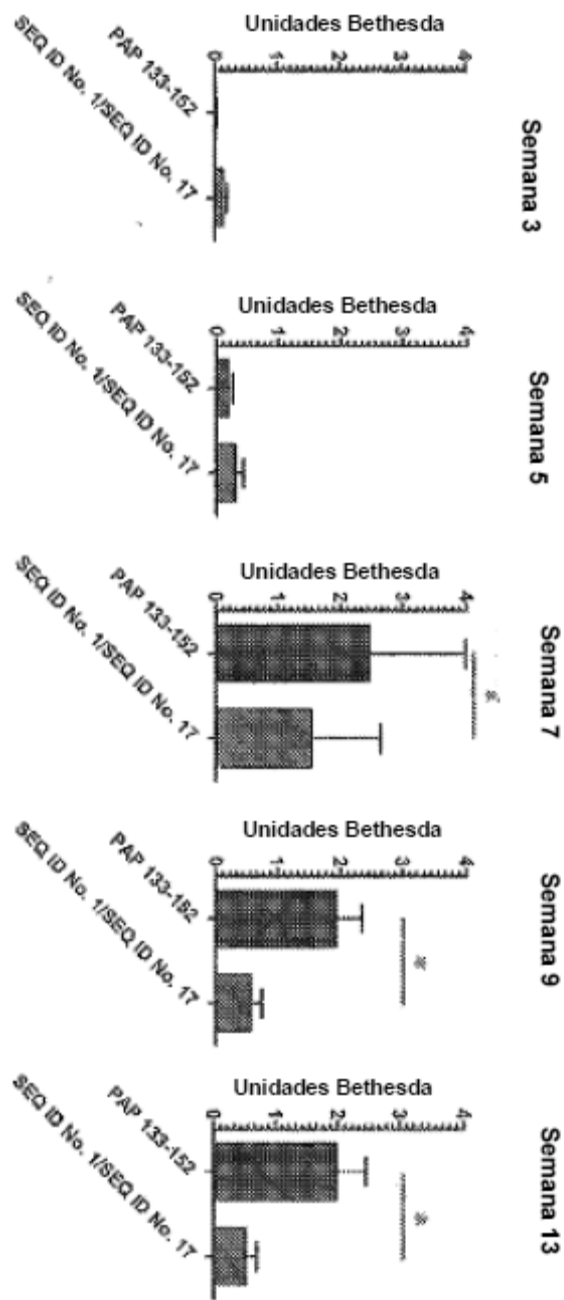


Figura 10