

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 039**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/37** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/US2011/058165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12058480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11796846 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2632479**

54 Título: **Péptidos de FVIII para la inducción de tolerancia inmunitaria e inmunodiagnóstico**

30 Prioridad:

**27.10.2010 US 407402 P**

**29.06.2011 US 201161502476 P**

**25.03.2011 US 201161467894 P**

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

**25.10.2017**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**

**One Baxter Parkway**

**Deerfield, IL 60015, CH y**

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STEINITZ, KATHARINA, NORA;**

**WILHELMINA VAN HELDEN, PAULA, MARIA;**

**REIPERT, BIRGIT, MARIA;**

**SCHWARZ, HANS-PETER y**

**EHRlich, HARTMUT**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 639 039 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 de FVIII para la inducción de tolerancia inmunitaria e inmunodiagnóstico

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 61/407.402, presentada el 27 de octubre 2010, la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 61/467.894, presentada el 25 de marzo de 2011 y la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 61/502.476, presentada el 29 de junio de 2011.

**Declaración sobre los derechos de invenciones realizadas bajo investigación o desarrollo patrocinado federalmente**

15 No aplicable

**Referencia a una "lista de secuencias", una tabla, o un apéndice de listado de programas informáticos presentado en un disco compacto**

20 No aplicable

**Antecedentes de la invención**

25 El factor VIII (FVIII) es una proteína encontrada en el plasma sanguíneo que actúa como cofactor en la cascada de reacciones que conduce a la coagulación sanguínea. La hemofilia A se produce por una reducción o deficiencia de la proteína FVIII funcional y es uno de los trastornos hemorrágicos más frecuentes que afecta a aproximadamente 1 de cada 5000-10000 hombres. Los síntomas clínicos en la hemofilia son frecuentes hemorragias en músculos y articulaciones, y los traumatismos pueden conducir incluso a situaciones potencialmente mortales. Actualmente, los tratamientos eficaces para la hemofilia incluyen reemplazar la proteína FVIII que falta usando aplicación intravenosa de productos de FVIII derivados de plasma o recombinantes. Tales preparaciones se administran generalmente o bien en respuesta a un episodio hemorrágico (terapia bajo demanda) o bien a intervalos frecuentes y regulares para prevenir la hemorragia no controlada (profilaxis). Desafortunadamente, la aparición de anticuerpos neutralizantes anti-FVIII (inhibidores de FVIII) es una complicación importante durante la terapia de reemplazo con productos de FVIII. Aproximadamente, el 25 % de los pacientes que reciben tratamiento desarrollan esta inmunidad a la proteína FVIII haciendo, por tanto, que el control adicional de las hemorragias sea muy difícil.

40 La causa de esta respuesta inmunitaria a la proteína FVIII no se ha elucidado completamente, pero los aspectos específicos del sistema inmunitario de un paciente pueden afectar a su respuesta a la terapia. Normalmente, el sistema inmunitario desarrolla una tolerancia a determinados antígenos, por ejemplo, "autoantígenos". Esta característica es importante porque, de otro modo, si un autoantígeno se reconoce como xenoantígeno, se produce enfermedad autoinmunitaria. Los pacientes con hemofilia A, en particular, tienen un defecto genético en su gen de FVIII, que hace que el sistema inmunitario no reconozca la proteína FVIII administrada como "autoantígeno". Por tanto, cuando se administra proteína FVIII durante la terapia de reemplazo del factor de coagulación, el sistema inmunitario del paciente reconoce la proteína FVIII como xenoantígeno o una proteína propia alterada y desarrolla por consiguiente anticuerpos anti-FVIII.

50 Los inhibidores de FVIII, es decir, anticuerpos anti-FVIII los producen células plasmáticas derivadas de células B específicas de FVIII. Las células B necesitan la ayuda de células T CD4<sup>+</sup> activadas para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas que producen anticuerpos anti-FVIII. Por ejemplo, la proteína FVIII es reconocida por los linfocitos B y T de diferentes maneras. La inducción de anticuerpos anti-FVIII es dependiente de células T cooperadoras. Las células B reconocen epitopos completos de las proteínas mediante su receptor del linfocito B específico. Por otro lado, las células T reconocen proteínas en forma de péptidos procesados complejados con una molécula de CMH de clase II presentada sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos. Cada clon de células T CD4<sup>+</sup> reconoce únicamente un complejo de péptido-CMH específico. Para presentar los péptidos a las células T, las moléculas de CMH de clase II tienen un surco de unión abierto que permite que péptidos de diversas longitudes se ajusten y se presenten sobre la superficie de una célula. Además, la proteína de CMH de clase II contiene cuatro cavidades de unión que difieren para los diversos haplotipos (Jones *et al.*, Nature Rev. Immunol. 6:271-282 (2006)). Únicamente aminoácidos específicos se ajustan en estas cavidades de unión, y el tamaño mínimo de los péptidos que se unen es de nueve aminoácidos. De manera notable, diferentes haplotipos de CMH de clase II pueden presentar diferentes péptidos. Por tanto, es probable que el haplotipo de CMH de clase II de un paciente influya en el riesgo de desarrollar anticuerpos anti-FVIII. De hecho, varios estudios han demostrado que hay una correlación entre el haplotipo de CMH de clase II humano HLA-DRB1\*1501 y un aumento del riesgo de aparición de anticuerpos anti-FVIII (Pavlova *et al.*, J. Thromb. Haemost. 7:2006-2015 (2009); Oldenburg *et al.*, Thromb. Haemost. 77:238-242 (1997); Hay *et al.*, Thromb. Haemost. 77:234-237 (1997)).

65 Se han explorado determinados enfoques para abordar los desafíos asociados con el tratamiento de la hemofilia

mediante la administración de proteína FVIII. Por ejemplo, el documento WO 03/087161 divulga proteínas FVIII modificadas, en las que las características inmunitarias de la proteína FVIII se modifican reduciendo o eliminando el número de epítomos de células T potenciales presentes en la proteína. Se identificaron varias regiones que incluyen epítomos de células T a lo largo de la proteína FVIII, incluyendo, por ejemplo, FVIII<sup>2030-2044</sup>. Según la divulgación, la eliminación de tales regiones pudo usarse para proporcionar proteína FVIII funcional que no indujo producción de anticuerpos anti-FVIII. El documento WO 09/071886 también divulga regiones específicas de la proteína FVIII que se predijo que dan lugar a péptidos de unión a HLA-DR2 que están implicados en la respuesta inmunitaria de un paciente, tales como, por ejemplo, FVIII<sup>475-495</sup>, FVIII<sup>542-562</sup>, FVIII<sup>1785-1805</sup> y FVIII<sup>2158-2178</sup>. Los péptidos se identificaron para su posible uso en la inducción de tolerancia inmunitaria en un paciente.

Aunque ha habido avances en la identificación de regiones de la proteína FVIII implicadas en la respuesta inmunitaria, existe todavía la necesidad de identificar otras regiones de la proteína FVIII que puedan usarse para desarrollar otros péptidos terapéuticos y metodologías que puedan, por ejemplo, usarse para tratar pacientes que tienen hemofilia A.

### Breve resumen de la invención

La presente invención se basa en la identificación de regiones de la proteína FVIII relacionadas con la respuesta inmunitaria frente a moléculas de FVIII. Más específicamente, puede usarse un péptido de FVIII que incluye la región de la proteína FVIII para inducir tolerancia a FVIII humano en pacientes con, por ejemplo, hemofilia A. Además, los péptidos de FVIII pueden usarse con fines de inmunodiagnóstico para monitorizar pacientes con hemofilia A durante la terapia de reemplazo y durante la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria. La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas 1-20.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inducir una tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método una etapa de: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en:  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que: P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 344, y 740;  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 10.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 10.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al

- menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 5 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 10 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 15 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 15 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, x e y son ambos cero.
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, x es uno e y es cero.
- 20 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, x es cero e y es uno.
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, x e y son ambos cero.
- 25 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el péptido consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos.
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el péptido consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos.
- 30 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el péptido consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos.
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la administración de la composición farmacéutica previene el desarrollo de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto.
- 35 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la administración de la composición farmacéutica reduce una cantidad de anticuerpos anti-FVIII presentes en el sujeto.
- 40 En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido según las reivindicaciones 1-5. La presente divulgación también proporciona un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que: P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740;  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno.
- 45 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 10.
- 50 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 10.
- En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68.
- 55 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68.
- 60 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68.
- 65 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.

- 5 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.
- 10 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 344.
- 15 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 20 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 25 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 30 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, P es una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 740.
- 35 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, x e y son ambos cero.
- 40 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, x es uno e y es cero.
- 45 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, x es cero e y es uno.
- 50 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, x e y son ambos cero.
- 55 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, el péptido consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos.
- 60 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, el péptido consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos.
- 65 En una realización de los péptidos proporcionados anteriormente, el péptido consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos.
- 70 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición según las reivindicaciones 6-8. La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un péptido tal como se describe en el presente documento.
- 75 En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición se formula para administración farmacéutica.
- 80 En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición comprende además un segundo polipéptido, consistiendo el segundo polipéptido en la secuencia de aminoácidos:  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$ , en la que: P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 477, 568, 659 y 740;  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno.
- 85 En un aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de un péptido de FVIII, comprendiendo el método las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y b) expresar el péptido en el cultivo de células.
- 90 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar una célula T específica de péptido de FVIII, comprendiendo el método: a) combinar una pluralidad de células T  $CD4^+$  aisladas o hibridomas con un péptido complejo con un multímero de CMH de clase II, en el que el péptido es un péptido de FVIII según una cualquiera

de las reivindicaciones 1 a 5; y b) identificar al menos uno de los miembros de la pluralidad de células T CD4<sup>+</sup> que es específica para el péptido complejado con el multímero de CMH de clase II.

5 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el multímero de CMH de clase II es un tetrámero de CMH de clase II.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el péptido o multímero de CMH de clase II comprende además un resto detectable.

10 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además aislar al menos una célula T CD4<sup>+</sup> que es específica para el péptido.

15 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la célula T CD4<sup>+</sup> se aísla usando citometría de flujo.

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de FVIII tal como se proporciona en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un segundo péptido.

20 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el segundo péptido es un péptido indicador.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la proteína de fusión está codificada por un ácido nucleico.

25 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el péptido de FVIII está unido químicamente al segundo péptido.

En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para inducir tolerancia inmunitaria hacia FVIII humano para la prevención del desarrollo de inhibidores de FVIII.

30 En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para inducir tolerancia hacia FVIII humano para el tratamiento de pacientes con inhibidores de FVIII establecidos.

35 En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para generar reactivos adecuados para tinción directa de células T específicas de FVIII (por ejemplo, multímeros de CMH de clase II o tetrámeros de CMH de clase II) en la monitorización inmunitaria de pacientes durante la terapia de reemplazo o durante la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria.

40 En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para identificar células T específicas de antígeno. En una realización, estos reactivos pueden usarse para rastrear células T específicas de FVIII en entornos *in vitro* y *ex vivo*. En otra realización, estos reactivos pueden usarse para aislar y caracterizar adicionalmente células T específicas de FVIII. En una realización, puede usarse clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o PCR unicelular para estos fines.

45 En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para monitorización inmunitaria de células T específicas de FVIII durante la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria.

En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para monitorización inmunitaria de células T específicas de FVIII durante el tratamiento con FVIII.

50 En un aspecto, los péptidos de FVIII proporcionados en el presente documento se usan para inmunodiagnóstico de células T específicas de FVIII durante el desarrollo clínico de nuevos moduladores inmunitarios para la prevención de inhibidores de FVIII.

#### 55 **Breve descripción de los dibujos**

No aplicable.

#### **Descripción detallada de la invención**

60 I. Introducción

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas 1-20.

65 La presente invención se refiere a péptidos de factor VIII (FVIII) que pueden usarse para inducir tolerancia a proteína FVIII en, por ejemplo, pacientes con hemofilia A. Además, los péptidos pueden usarse para fines de inmunodiagnóstico para monitorizar células T específicas de FVIII en pacientes con hemofilia A durante la terapia de

reemplazo y durante la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que varias regiones de FVIII, específicamente FVIII<sup>120-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> y FVIII<sup>1401-1424</sup>, están implicadas en la respuesta inmunitaria montada frente a la proteína FVIII durante la terapia de reemplazo de factor VIII o conectadas con hemofilia adquirida. Las secuencias de aminoácidos de las regiones identificadas son TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68) y QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), respectivamente. Se cree que la presente invención proporciona, por primera vez, la identificación de estas regiones de proteína FVIII y su relación con la respuesta inmunitaria a la proteína FVIII.

Los péptidos según la presente invención incluyen péptidos que tienen al menos una porción de las regiones FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> y FVIII<sup>1401-1424</sup> que se compleja con una molécula de CMH de clase II para producir un epítipo de células T capaz de ser reconocido por células T implicadas en la respuesta inmunitaria de un paciente. En algunas realizaciones, los péptidos incluyen al menos nueve aminoácidos contiguos que corresponden a nueve aminoácidos contiguos de FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>1401-1424</sup>. Tal como se describe adicionalmente a continuación, los péptidos proporcionados en el presente documento también incluyen péptidos más largos de nueve aminoácidos de longitud así como variantes de las secuencias de FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> y FVIII<sup>1401-1424</sup>. Una identificación de este tipo de los péptidos de la presente invención puede tener implicaciones en la mejora y el avance de estrategias terapéuticas diseñadas para tratar enfermedades relacionadas con la coagulación sanguínea, tales como hemofilia A.

## II. Definiciones

El término "proteína factor VIII" o "proteína FVIII" se refiere a cualquier molécula de FVIII que tiene al menos una porción del dominio B intacta, y que presenta actividad biológica que está asociada con proteína FVIII humana nativa. La molécula de FVIII puede ser FVIII de longitud completa. La molécula de FVIII también puede ser una variante modificada de manera conservativa de FVIII nativo. La proteína FVIII puede derivarse de plasma humano o producirse mediante técnicas de ingeniería genética. Puede encontrarse caracterización adicional de la proteína FVIII, por ejemplo, en los párrafos [0042]-[0055] en el documento US 2010/0168018.

El término "péptido de factor VIII" o "péptido de FVIII" se refiere a los péptidos descritos en el presente documento que incluyen una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región de la proteína FVIII que se ha descubierto que es importante en una respuesta inmunitaria frente a FVIII. Un péptido de FVIII incluye al menos nueve aminoácidos que se complejan con una proteína de CMH de clase II para la presentación a células T implicadas en la respuesta inmunitaria. Pueden estar presentes aminoácidos adicionales en cualquier extremo del núcleo de al menos nueve aminoácidos del péptido. En algunas realizaciones, un péptido de FVIII puede incluir una secuencia idéntica a la región particular de proteína FVIII humana nativa. En otras realizaciones, un péptido de FVIII puede ser una variante modificada de manera conservativa de una región de la proteína FVIII. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, un péptido de FVIII puede caracterizarse por un determinado porcentaje de identidad, por ejemplo, el 85 % idéntico, en relación con la secuencia de una región de proteína FVIII humana nativa.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos no naturales y que se producen de manera natural, incluyendo análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural incluyen los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, y-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los aminoácidos que se producen de manera natural pueden incluir, por ejemplo, aminoácidos D y L. Los aminoácidos usados en el presente documento también pueden incluir aminoácidos no naturales. Análogos de aminoácido se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, cualquier carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina o metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. Miméticos de aminoácido se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido que se produce de manera natural. Puede hacerse referencia a los aminoácidos en el presente documento o bien por sus símbolos de tres letras frecuentemente conocidos o bien por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Del mismo modo, puede hacerse referencia a los nucleótidos por sus códigos de una única letra frecuentemente aceptados.

"Variantes modificadas de manera conservativa" se aplica a tanto secuencias de aminoácido como a secuencias de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas de manera conservativa se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier péptido dado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el

aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que una alanina se especifica por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, una persona de experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico o péptido que altera, añade o delecióna un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de manera conservativa” en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservativa son además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M). Véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984).

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o péptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente el 60 % de identidad, preferiblemente el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, de identidad o superior a lo largo de una región especificada, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada) tal como se mide usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos a continuación, o por alineación manual e inspección visual.

Por “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente” en el presente documento quiere decirse una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá determinarla el experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Augsburger & Hoag, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 3ª ed. 2008); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (3ª ed., 2008); Pickar, Dosage Calculations (8ª ed., 2007); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 2ª ed., 2005, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

### III. Péptidos de FVIII

La presente invención se refiere a péptidos de FVIII que corresponden a regiones de la proteína FVIII implicadas en una respuesta inmunitaria frente a FVIII, tal como se define en las reivindicaciones 1-5. También se divulga un péptido de FVIII que consiste en una secuencia de nueve aminoácidos consecutivos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos de una de las siguientes secuencias de aminoácidos: AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68); QANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344); o TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), en las que el péptido consiste en desde 9 hasta 180 aminoácidos.

En una realización específica, el péptido de FVIII tiene la secuencia:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68, 344 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno. En una realización,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos.

En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos

que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Generalmente, los péptidos de FVIII según la presente invención pueden incluir cualquier secuencia de aminoácidos presente en la región identificada de FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>1401-1424</sup> o una variante modificada que puede, por ejemplo, conservar una función similar o idéntica a FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>1401-1424</sup>. En particular, los péptidos de FVIII de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos que incluye un epítipo de células T. Los péptidos de FVIII incluyen una secuencia de al menos nueve aminoácidos que puede oscilar en porcentaje de identidad en relación con la secuencia de aminoácidos AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68); QANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344); o TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740). Por ejemplo, un péptido de FVIII puede tener nueve aminoácidos que son idénticos o al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 85 % por ciento idénticos a cualquiera de nueve aminoácidos consecutivos de FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>1401-1424</sup>.

En otro grupo de realizaciones, los péptidos de FVIII pueden tener secuencias de aminoácidos mayores de nueve aminoácidos, en los que las secuencias de aminoácidos incluyen una región que puede ser idéntica o al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % por ciento idéntica a la secuencia de aminoácidos consecutivos de FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>1401-1424</sup>. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que pueden usarse técnicas de mutagénesis conocidas, tales como sustitución de alanina para identificar variantes modificadas que conservan la función de la región de FVIII<sup>102-122</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>1401-1424</sup>.

Además, los péptidos de FVIII pueden incluir otras secuencias de aminoácidos adicionales en cualquier extremo de la secuencia principal de los péptidos de FVIII comentados anteriormente. Las secuencias adicionales se designan  $(R^1)_x$  y  $(R^2)_y$ . En determinadas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  pueden oscilar entre 1 y aproximadamente 80 aminoácidos de longitud. Alternativamente,  $R^1$  y  $R^2$  pueden oscilar entre 1 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud. En determinadas realizaciones, cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En aún otras realizaciones más, x puede ser cero e y puede ser uno. En otra realización, tanto x como y son uno. Pueden añadirse aminoácidos adicionales en cualquier extremo por una variedad de motivos, incluyendo aumento de la estabilidad de los péptidos, mejora en la unión a moléculas de CMH de clase II y/o células T, así como otros aspectos que apreciará una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

En una realización, se proporciona un péptido que tiene la secuencia  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una región de factor VIII identificada en la tabla 1,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno. Alternativamente,  $R^1$  y  $R^2$  pueden oscilar entre 1 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una región de factor VIII identificada en la tabla 1. En otra realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una región de factor VIII identificada en la tabla 1. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno. En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos.

Tabla 1. Regiones de FVIII que incluyen epítopos de células T

Regiones que incluyen epítopos de células T	Secuencia de aminoácidos
FVIII <sup>102-119</sup>	TVVITLKNMASHPVSLHA (SEQ ID NO: 10)

FVIII <sup>246-266</sup>	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68)
FVIII <sup>474-494</sup>	GEVGDLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159)
FVIII <sup>540-560</sup>	PTKSDPRCLTRYSSSFVNMER (SEQ ID NO: 250)
FVIII <sup>1401-1424</sup>	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344)
FVIII <sup>1785-1805</sup>	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477)
FVIII <sup>2025-2045</sup>	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568)
FVIII <sup>2160-2180</sup>	NPPIIARYIRLHPTHYSIRST (SEQ ID NO: 659)
FVIII <sup>102-122</sup>	TVVITLKNMASHPVS LHAVGV (SEQ ID NO: 740)

Tal como se describió anteriormente, los péptidos de FVIII de la presente invención pueden incluir cualquier secuencia de aminoácidos presente en la región identificada de FVIII<sup>1401-1424</sup> o una variante modificada que puede, por ejemplo, conservar una función similar o idéntica a FVIII<sup>1401-1424</sup>. En determinadas realizaciones, los péptidos pueden cubrir el dominio B completo de proteína FVIII humana. También pueden incluirse otros péptidos de FVIII que incluyen un péptido que tiene una secuencia de al menos nueve aminoácidos que puede oscilar en porcentaje de identidad en relación con una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: GEVGDLLIIFKNQASRPYNI (FVIII<sup>474-494</sup>; SEQ ID NO: 159), PTKSDPRCLTRYSSSFVNMER (FVIII<sup>540-560</sup>; SEQ ID NO: 250), EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (FVIII<sup>1785-1805</sup>; SEQ ID NO: 477), LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (FVIII<sup>2025-2045</sup>; SEQ ID NO: 568), NPPIIARYIRLHPTHYSIRST (FVIII<sup>2160-2180</sup>; SEQ ID NO: 659), TVVITLKNMASHPVS LHA (FVIII<sup>102-119</sup>; SEQ ID NO: 10), AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (FVIII<sup>246-266</sup>; SEQ ID NO: 68) y TVVITLKNMASHPVS LHAVGV (FVIII<sup>102-122</sup>; SEQ ID NO: 740).

Por ejemplo, los péptidos de FVIII que tienen nueve aminoácidos que son idénticos o al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 85 % por ciento idénticos a cualquiera de nueve aminoácidos consecutivos de FVIII<sup>474-494</sup>, FVIII<sup>540-560</sup>, FVIII<sup>1785-1805</sup>, FVIII<sup>2025-2045</sup>, FVIII<sup>2160-2180</sup>, FVIII<sup>102-119</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>102-122</sup>. En otro grupo de realizaciones, los péptidos de FVIII pueden tener secuencias de aminoácidos mayores de nueve aminoácidos, en los que las secuencias de aminoácidos pueden ser idénticas o al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % por ciento idénticas a cualquiera de nueve aminoácidos consecutivos de FVIII<sup>474-494</sup>, FVIII<sup>540-560</sup>, FVIII<sup>1785-1805</sup>, FVIII<sup>2025-2045</sup>, FVIII<sup>2160-2180</sup>, FVIII<sup>102-119</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>102-122</sup>. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que pueden usarse técnicas de mutagénesis conocidas, tales como sustitución de alanina para identificar variantes modificadas que conservan la función de las regiones de FVIII<sup>474-494</sup>, FVIII<sup>540-560</sup>, FVIII<sup>1785-1805</sup>, FVIII<sup>2025-2045</sup>, FVIII<sup>2160-2180</sup>, FVIII<sup>102-119</sup>, FVIII<sup>246-266</sup> o FVIII<sup>102-122</sup>. Los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento pueden producirse usando métodos descritos anteriormente con respecto a los péptidos de FVIII relacionados con FVIII<sup>1401-1424</sup>.

#### A. Péptidos de factor VIII<sup>102-119</sup>

También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>102-119</sup> que tiene la secuencia: TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO: 10),  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>102-119</sup> que tiene la secuencia: TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO: 10). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 a 55 (SEQ ID NO: 10). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 a 55. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por

separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

5 En determinadas realizaciones, R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII  
10 consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Tabla 2. Péptidos de FVIII<sup>102-119</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>102-119</sup> -1	TVVITLKNM	1
FVIII <sup>102-119</sup> -2	TVVITLKNMA	2
FVIII <sup>102-119</sup> -3	TVVITLKNMAS	3
FVIII <sup>102-119</sup> -4	TVVITLKNMASH	4
FVIII <sup>102-119</sup> -5	TVVITLKNMASHP	5
FVIII <sup>102-119</sup> -6	TVVITLKNMASHPV	6
FVIII <sup>102-119</sup> -7	TVVITLKNMASHPVS	7
FVIII <sup>102-119</sup> -8	TVVITLKNMASHPVSL	8
FVIII <sup>102-119</sup> -9	TVVITLKNMASHPVSLH	9
FVIII <sup>102-119</sup> -10	TVVITLKNMASHPVSLHA	10
FVIII <sup>102-119</sup> -11	VVITLKNMA	11
FVIII <sup>102-119</sup> -12	VVITLKNMAS	12
FVIII <sup>102-119</sup> -13	VVITLKNMASH	13
FVIII <sup>102-119</sup> -14	VVITLKNMASHP	14
FVIII <sup>102-119</sup> -15	VVITLKNMASHPV	15
FVIII <sup>102-119</sup> -16	VVITLKNMASHPVS	16
FVIII <sup>102-119</sup> -17	WITLKNMASHPVSL	17
FVIII <sup>102-119</sup> -18	VVITLKNMASHPVSLH	18
FVIII <sup>102-119</sup> -19	VVITLKNMASHPVSLHA	19
FVIII <sup>102-119</sup> -20	VITLKNMAS	20
FVIII <sup>102-119</sup> -21	VITLKNMASH	21
FVIII <sup>102-119</sup> -22	VITLKNMASHP	22
FVIII <sup>102-119</sup> -23	VITLKNMASHPV	23
FVIII <sup>102-119</sup> -24	VITLKNMASHPVS	24
FVIII <sup>102-119</sup> -25	VITLKNMASHPVSL	25
FVIII <sup>102-119</sup> -26	VITLKNMASHPVSLH	26
FVIII <sup>102-119</sup> -27	VITLKNMASHPVSLHA	27
FVIII <sup>102-119</sup> -28	ITLKNMASH	28
FVIII <sup>102-119</sup> -29	ITLKNMASHP	29
FVIII <sup>102-119</sup> -30	ITLKNMASHPV	30
FVIII <sup>102-119</sup> -31	ITLKNMASHPVS	31
FVIII <sup>102-119</sup> -32	ITLKNMASHPVSL	32
FVIII <sup>102-119</sup> -33	ITLKNMASHPVSLH	33
FVIII <sup>102-119</sup> -34	ITLKNMASHPVSLHA	34
FVIII <sup>102-119</sup> -35	TLKNMASHP	35
FVIII <sup>102-119</sup> -36	TLKNMASHPV	36
FVIII <sup>102-119</sup> -37	TLKNMASHPVS	37
FVIII <sup>102-119</sup> -38	TLKNMASHPVSL	38
FVIII <sup>102-119</sup> -39	TLKNMASHPVSLH	39
FVIII <sup>102-119</sup> -40	TLKNMASHPVSLHA	40
FVIII <sup>102-119</sup> -41	LKNMASHPV	41
FVIII <sup>102-119</sup> -42	LKNMASHPVS	42
FVIII <sup>102-119</sup> -43	LKNMASHPVSL	43
FVIII <sup>102-119</sup> -44	LKNMASHPVSLH	44
FVIII <sup>102-119</sup> -45	LKNMASHPVSLHA	45

FVIII <sup>102-119</sup> -46	KNMASHPVS	46
FVIII <sup>102-119</sup> -47	KNMASHPVSL	47
FVIII <sup>102-119</sup> -48	KNMASHPVSLH	48
FVIII <sup>102-119</sup> -49	KNMASHPVSLHA	49
FVIII <sup>102-119</sup> -50	NMASHPVSL	50
FVIII <sup>102-119</sup> -51	NMASIIPVSLII	51
FVIII <sup>102-119</sup> -52	NMASHPVSLHA	52
FVIII <sup>102-119</sup> -53	MASHPVSLH	53
FVIII <sup>102-119</sup> -54	MASHPVSLHA	54
FVIII <sup>102-119</sup> -55	ASHPVSLHA	55

B. Péptidos de factor VIII<sup>246-266</sup>

5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>, en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup> que tiene la secuencia: AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

10 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup> que tiene la secuencia: AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup> que tiene la secuencia: AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 56 a 146. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 56 a 146. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 56 a 146. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 56 a 146. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

25 En una realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

40 En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

50 Tabla 3. Péptidos de FVIII<sup>246-266</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>246-266</sup> -1	AWPKMHTVN	56
FVIII <sup>246-266</sup> -2	AWPKMHTVNG	57
FVIII <sup>246-266</sup> -3	AWPKMHTVNGY	58

ES 2 639 039 T3

FVIII <sup>246-266</sup> -4	AWPKMHTVNGYV	59
FVIII <sup>246-266</sup> -5	AWPKMHTVNGYVN	60
FVIII <sup>246-266</sup> -6	AWPKMHTVNGYVNR	61
FVIII <sup>246-266</sup> -7	AWPKMHTVNGYVNRS	62
FVIII <sup>246-266</sup> -8	AWPKMHTVNGYVNRSL	63
FVIII <sup>246-266</sup> -9	AWPKMHTVNGYVNRSLP	64
FVIII <sup>246-266</sup> -10	AWPKMHTVNGYVNRSLPG	65
FVIII <sup>246-266</sup> -11	AWPKMHTVNGYVNRSPLGL	66
FVIII <sup>246-266</sup> -12	AWPKMHTVNGYVNRSPLGLI	67
FVIII <sup>246-266</sup> -13	AWPKMHTVNGYVNRSPLGLIG	68
FVIII <sup>246-266</sup> -14	WPKMHTVNG	69
FVIII <sup>246-266</sup> -15	WPKMHTVNGY	70
FVIII <sup>246-266</sup> -16	WPKMHTVNGYV	71
FVIII <sup>246-266</sup> -17	WPKMHTVNGYVN	72
FVIII <sup>246-266</sup> -18	WPKMHTVNGYVNR	73
FVIII <sup>246-266</sup> -19	WPKMHTVNGYVNRS	74
FVIII <sup>246-266</sup> -20	WPKMHTVNGYVNRSL	75
FVIII <sup>246-266</sup> -21	WPKMHTVNGYVNRSLP	76
FVIII <sup>246-266</sup> -22	WPKMHTVNGYVNRSLPG	77
FVIII <sup>246-266</sup> -23	WPKMHTVNGYVNRSPLGL	78
FVIII <sup>246-266</sup> -24	WPKMHTVNGYVNRSPLGLI	79
FVIII <sup>246-266</sup> -25	WPKMHTVNGYVNRSPLGLIG	80
FVIII <sup>246-266</sup> -26	PKMHTVNGY	81
FVIII <sup>246-266</sup> -27	PKMHTVNGYV	82
FVIII <sup>246-266</sup> -28	PKMHTVNGYVN	83
FVIII <sup>246-266</sup> -29	PKMHTVNGYVNR	84
FVIII <sup>246-266</sup> -30	PKMHTVNGYVNRS	85
FVIII <sup>246-266</sup> -31	PKMHTVNGYVNRSL	86
FVIII <sup>246-266</sup> -32	PKMHTVNGYVNRSLP	87
FVIII <sup>246-266</sup> -33	PKMHTVNGYVNRSLPG	88
FVIII <sup>246-266</sup> -34	PKMHTVNGYVNRSPLGL	89
FVIII <sup>246-266</sup> -35	PKMHTVNGYVNRSPLGLI	90
FVIII <sup>246-266</sup> -36	PKMHTVNGYVNRSPLGLIG	91
FVIII <sup>246-266</sup> -37	KMHTVNGYV	92
FVIII <sup>246-266</sup> -38	KMHTVNGYVN	93
FVIII <sup>246-266</sup> -39	KMHTVNGYVNR	94
FVIII <sup>246-266</sup> -40	KMHTVNGYVNRS	95
FVIII <sup>246-266</sup> -41	KMHTVNGYVNRSL	96
FVIII <sup>246-266</sup> -42	KMHTVNGYVNRSLP	97
FVIII <sup>246-266</sup> -43	KMHTVNGYVNRSLPG	98
FVIII <sup>246-266</sup> -44	KMHTVNGYVNRSPLGL	99
FVIII <sup>246-266</sup> -45	KMHTVNGYVNRSPLGLI	100
FVIII <sup>246-266</sup> -46	KMHTVNGYVNRSPLGLIG	101
FVIII <sup>246-266</sup> -47	MHTVNGYVN	102
FVIII <sup>246-266</sup> -48	MHTVNGYVNR	103
FVIII <sup>246-266</sup> -49	MHTVNGYVNRS	104
FVIII <sup>246-266</sup> -50	MHTVNGYVNRSL	105
FVIII <sup>246-266</sup> -51	MHTVNGYVNRSLP	106
FVIII <sup>246-266</sup> -52	MHTVNGYVNRSLPG	107
FVIII <sup>246-266</sup> -53	MHTVNGYVNRSPLGL	108
FVIII <sup>246-266</sup> -54	MHTVNGYVNRSPLGLI	109
FVIII <sup>246-266</sup> -55	MHTVNGYVNRSPLGLIG	110
FVIII <sup>246-266</sup> -56	HTVNGYVNR	111
FVIII <sup>246-266</sup> -57	HTVNGYVNRS	112
FVIII <sup>246-266</sup> -58	HTVNGYVNRSL	113
FVIII <sup>246-266</sup> -59	HTVNGYVNRSLP	114
FVIII <sup>246-266</sup> -60	HTVNGYVNRSLPG	115
FVIII <sup>246-266</sup> -61	HTVNGYVNRSPLGL	116
FVIII <sup>246-266</sup> -62	HTVNGYVNRSPLGLI	117
FVIII <sup>246-266</sup> -63	HTVNGYVNRSPLGLIG	118
FVIII <sup>246-266</sup> -64	TVNGYVNRS	119
FVIII <sup>246-266</sup> -65	TVNGYVNRSL	120
FVIII <sup>246-266</sup> -66	TVNGYVNRSLP	121

FVIII <sup>246-266</sup> -67	TVNGYVNRSLPG	122
FVIII <sup>246-266</sup> -68	TVNGYVNRSLPGL	123
FVIII <sup>246-266</sup> -69	TVNGYVNRSLPGLI	124
FVIII <sup>246-266</sup> -70	TVNGYVNRSLPGLIG	125
FVIII <sup>246-266</sup> -71	VNGYVNRSL	126
FVIII <sup>246-266</sup> -72	VNGYVNRSLP	127
FVIII <sup>246-266</sup> -73	VNGYVNRSLPG	128
FVIII <sup>246-266</sup> -74	VNGYVNRSLPGL	129
FVIII <sup>246-266</sup> -75	VNGYVNRSLPGLI	130
FVIII <sup>246-266</sup> -76	VNGYVNRSLPGLIG	131
FVIII <sup>246-266</sup> -77	NGYVNRSLP	132
FVIII <sup>246-266</sup> -78	NGYVNRSLPG	133
FVIII <sup>246-266</sup> -79	NGYVNRSLPGL	134
FVIII <sup>246-266</sup> -80	NGYVNRSLPGLI	135
FVIII <sup>246-266</sup> -81	NGYVNRSLPGLIG	136
FVIII <sup>246-266</sup> -82	GYVNRSLPG	137
FVIII <sup>246-266</sup> -83	GYVNRSLPGL	138
FVIII <sup>246-266</sup> -84	GYVNRSLPGLT	139
FVIII <sup>246-266</sup> -85	GYVNRSLPGLIG	140
FVIII <sup>246-266</sup> -86	YVNRSLPGL	141
FVIII <sup>246-266</sup> -87	YVNRSLPGLI	142
FVIII <sup>246-266</sup> -88	YVNRSLPGLIG	143
FVIII <sup>246-266</sup> -89	VNRSLPGLI	144
FVIII <sup>246-266</sup> -90	VNRSLPGLIG	145
FVIII <sup>246-266</sup> -91	NRSLPGLIG	146

C. Péptidos de factor VIII<sup>474-494</sup>

5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>, en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>474-494</sup> que tiene la secuencia: GEVGD<sup>474</sup>TL<sup>475</sup>LI<sup>476</sup>IF<sup>477</sup>KN<sup>478</sup>QAS<sup>479</sup>RP<sup>480</sup>Y<sup>481</sup>NI (SEQ ID NO: 159), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

10 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>474-494</sup> que tiene la secuencia: GEVGD<sup>474</sup>TL<sup>475</sup>LI<sup>476</sup>IF<sup>477</sup>KN<sup>478</sup>QAS<sup>479</sup>RP<sup>480</sup>Y<sup>481</sup>NI (SEQ ID NO: 159). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>474-494</sup> que tiene la secuencia: GEVGD<sup>474</sup>TL<sup>475</sup>LI<sup>476</sup>IF<sup>477</sup>KN<sup>478</sup>QAS<sup>479</sup>RP<sup>480</sup>Y<sup>481</sup>NI (SEQ ID NO: 159). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 147 a 237. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 147 a 237. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 147 a 237. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

25 En determinadas realizaciones, R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

35 Tabla 4. Péptidos de FVIII<sup>474-494</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>474-494</sup> -1	GEVGD <sup>474</sup> TL <sup>475</sup> LI <sup>476</sup>	147

ES 2 639 039 T3

FVIII <sup>474-494</sup> -2	GEVGDTLLII	148
FVIII <sup>474-494</sup> -3	GEVGDTLLIIF	149
FVIII <sup>474-494</sup> -4	GEVGDTLLIIFK	150
FVIII <sup>474-494</sup> -5	GEVGDTLLIIFKN	151
FVIII <sup>474-494</sup> -6	GEVGDTLLIIFKNQ	152
FVIII <sup>474-494</sup> -7	GEVGDTLLIIFKNQA	153
FVIII <sup>474-494</sup> -8	GEVGDTLLIIFKNQAS	154
FVIII <sup>474-494</sup> -9	GEVGDTLLIIFKNQASR	155
FVIII <sup>474-494</sup> -10	GEVGDTLLIIFKNQASRP	156
FVIII <sup>474-494</sup> -11	GEVGDTLLIIFKNQASRPY	157
FVIII <sup>474-494</sup> -12	GEVGDTLLIIFKNQASRPYN	158
FVIII <sup>474-494</sup> -13	GEVGDTLLIIFKNQASRPYNI	159
FVIII <sup>474-494</sup> -14	EVGDTLLII	160
FVIII <sup>474-494</sup> -15	EVGDTLLIIF	161
FVIII <sup>474-494</sup> -16	EVGDTLLIIFK	162
FVIII <sup>474-494</sup> -17	EVGDTLLIIFKN	163
FVIII <sup>474-494</sup> -18	EVGDTLLIIFKNQ	164
FVIII <sup>474-494</sup> -19	EVGDTLLIIFKNQA	165
FVIII <sup>474-494</sup> -20	EVGDTLLIIFKNQAS	166
FVIII <sup>474-494</sup> -21	EVGDTLLIIFKNQASR	167
FVIII <sup>474-494</sup> -22	EVGDTLLIIFKNQASRP	168
FVIII <sup>474-494</sup> -23	EVGDTLLIIFKNQASRPY	169
FVIII <sup>474-494</sup> -24	EVGDTLLIIFKNQASRPYN	170
FVIII <sup>474-494</sup> -25	EVGDTLLIIFKNQASRPYNI	171
FVIII <sup>474-494</sup> -26	VGDTLLIIF	172
FVIII <sup>474-494</sup> -27	VGDTLLIIFK	173
FVIII <sup>474-494</sup> -28	VGDTLLIIFKN	174
FVIII <sup>474-494</sup> -29	VGDTLLIIFKNQ	175
FVIII <sup>474-494</sup> -30	VGDTLLIIFKNQA	176
FVIII <sup>474-494</sup> -31	VGDTLLIIFKNQAS	177
FVIII <sup>474-494</sup> -32	VGDTLLIIFKNQASR	178
FVIII <sup>474-494</sup> -33	VGDTLLIIFKNQASRP	179
FVIII <sup>474-494</sup> -34	VGDTLLIIFKNQASRPY	180
FVIII <sup>474-494</sup> -35	VGDTLLIIFKNQASRPYN	181
FVIII <sup>474-494</sup> -36	VGDTLLIIFKNQASRPYNI	182
FVIII <sup>474-494</sup> -37	GDTLLIIFK	183
FVIII <sup>474-494</sup> -38	GDTLLIIFKN	184
FVIII <sup>474-494</sup> -39	GDTLLIIFKNQ	185
FVIII <sup>474-494</sup> -40	GDTLLIIFKNQA	186
FVIII <sup>474-494</sup> -41	GDTLLIIFKNQAS	187
FVIII <sup>474-494</sup> -42	GDTLLIIFKNQASR	188
FVIII <sup>474-494</sup> -43	GDTLLIIFKNQASRP	189
FVIII <sup>474-494</sup> -44	GDTLLIIFKNQASRPY	190
FVIII <sup>474-494</sup> -45	GDTLLIIFKNQASRPYN	191
FVIII <sup>474-494</sup> -46	GDTLLIIFKNQASRPYNI	192
FVIII <sup>474-494</sup> -47	DTLLIIFKN	193
FVIII <sup>474-494</sup> -48	DTLLIIFKNQ	194
FVIII <sup>474-494</sup> -49	DTLLIIFKNQA	195
FVIII <sup>474-494</sup> -50	DTLLIIFKNQAS	196
FVIII <sup>474-494</sup> -51	DTLLIIFKNQASR	197
FVIII <sup>474-494</sup> -52	DTLLIIFKNQASRP	198
FVIII <sup>474-494</sup> -53	DTLLIIFKNQASRPY	199
FVIII <sup>474-494</sup> -54	DTLLIIFKNQASRPYN	200
FVIII <sup>474-494</sup> -55	DTLLIIFKNQASRPYNI	201
FVIII <sup>474-494</sup> -56	TLLIIFKNQ	202
FVIII <sup>474-494</sup> -57	TLLIIFKNQA	203
FVIII <sup>474-494</sup> -58	TLLIIFKNQAS	204
FVIII <sup>474-494</sup> -59	TLLIIFKNQASR	205
FVIII <sup>474-494</sup> -60	TLLIIFKNQASRP	206
FVIII <sup>474-494</sup> -61	TLLIIFKNQASRPY	207
FVIII <sup>474-494</sup> -62	TLLIIFKNQASRPYN	208
FVIII <sup>474-494</sup> -63	TLLIIFKNQASRPYNI	209
FVIII <sup>474-494</sup> -64	LLIIFKNQA	210

FVIII <sup>474-494</sup> -65	LLIIFKNQAS	211
FVIII <sup>474-494</sup> -66	LLIIFKNQASR	212
FVIII <sup>474-494</sup> -67	LLIIFKNQASRP	213
FVIII <sup>474-494</sup> -68	LLIIFKNQASRPY	214
FVIII <sup>474-494</sup> -69	LLIIFKNQASRPYN	215
FVIII <sup>474-494</sup> -70	LLIIFKNQASRPYNI	216
FVIII <sup>474-494</sup> -71	LIIFKNQAS	217
FVIII <sup>474-494</sup> -72	LIIFKNQASR	218
FVIII <sup>474-494</sup> -73	LIIFKNQASRP	219
FVIII <sup>474-494</sup> -74	LIIFKNQASRPY	220
FVIII <sup>474-494</sup> -75	LIIFKNQASRPYN	221
FVIII <sup>474-494</sup> -76	LIIFKNQASRPYNI	222
FVIII <sup>474-494</sup> -77	IIFKNQASR	223
FVIII <sup>474-494</sup> -78	IIFKNQASRP	224
FVIII <sup>474-494</sup> -79	IIFKNQASRPY	225
FVIII <sup>474-494</sup> -80	IIFKNQASRPYN	226
FVIII <sup>474-494</sup> -81	IIFKNQASRPYNI	227
FVIII <sup>474-494</sup> -82	IFKNQASRP	228
FVIII <sup>474-494</sup> -83	IFKNQASRPY	229
FVIII <sup>474-494</sup> -84	IFKNQASRPYN	230
FVIII <sup>474-494</sup> -85	IFKNQASRPYNI	231
FVIII <sup>474-494</sup> -86	FKNQASRPY	232
FVIII <sup>474-494</sup> -87	FKNQASRPYN	233
FVIII <sup>474-494</sup> -88	FKNQASRPYNI	234
FVIII <sup>474-494</sup> -89	KNQASRPYN	235
FVIII <sup>474-494</sup> -90	KNQASRPYNI	236
FVIII <sup>474-494</sup> -91	NQASRPYNI	237

D. Péptidos de factor VIII<sup>540-560</sup>

- 5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>540-560</sup> que tiene la secuencia: PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO: 250), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.
- 10 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>540-560</sup> que tiene la secuencia: PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO: 250). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>540-560</sup> que tiene la secuencia: PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO: 250). En una
- 15 realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 238 a 328. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 238 a 328. En una
- 20 realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 238 a 328. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 238 a 328. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.
- 25 En una realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o
- 30 ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias
- 35 de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44,

45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

5 En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Tabla 5. Péptidos de FVIII<sup>540-560</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>540-560</sup> -1	PTKSDPRCL	238
FVIII <sup>540-560</sup> -2	PTKSDPRCLT	239
FVIII <sup>540-560</sup> -3	PTKSDPRCLTR	240
FVIII <sup>540-560</sup> -4	PTKSDPRCLTRY	241
FVIII <sup>540-560</sup> -5	PTKSDPRCLTRY	242
FVIII <sup>540-560</sup> -6	PTKSDPRCLTRYYS	243
FVIII <sup>540-560</sup> -7	PTKSDPRCLTRYSS	244
FVIII <sup>540-560</sup> -8	PTKSDPRCLTRYSSF	245
FVIII <sup>540-560</sup> -9	PTKSDPRCLTRYSSFV	246
FVIII <sup>540-560</sup> -10	PTKSDPRCLTRYSSFVN	247
FVIII <sup>540-560</sup> -11	PTKSDPRCLTRYSSFVNM	248
FVIII <sup>540-560</sup> -12	PTKSDPRCLTRYSSFVNME	249
FVIII <sup>540-560</sup> -13	PTKSDPRCLTRYSSFVNMER	250
FVIII <sup>540-560</sup> -14	TKSDPRCLT	251
FVIII <sup>540-560</sup> -15	TKSDPRCLTR	252
FVIII <sup>540-560</sup> -16	TKSDPRCLTRY	253
FVIII <sup>540-560</sup> -17	TKSDPRCLTRY	254
FVIII <sup>540-560</sup> -18	TKSDPRCLTRYYS	255
FVIII <sup>540-560</sup> -19	TKSDPRCLTRYSS	256
FVIII <sup>540-560</sup> -20	TKSDPRCLTRYSSF	257
FVIII <sup>540-560</sup> -21	TKSDPRCLTRYSSFV	258
FVIII <sup>540-560</sup> -22	TKSDPRCLTRYSSFVN	259
FVIII <sup>540-560</sup> -23	TKSDPRCLTRYSSFVNM	260
FVIII <sup>540-560</sup> -24	TKSDPRCLTRYSSFVNME	261
FVIII <sup>540-560</sup> -25	TKSDPRCLTRYSSFVNMER	262
FVIII <sup>540-560</sup> -26	KSDPRCLTR	263
FVIII <sup>540-560</sup> -27	KSDPRCLTRY	264
FVIII <sup>540-560</sup> -28	KSDPRCLTRY	265
FVIII <sup>540-560</sup> -29	KSDPRCLTRYYS	266
FVIII <sup>540-560</sup> -30	KSDPRCLTRYSS	267
FVIII <sup>540-560</sup> -31	KSDPRCLTRYSSF	268
FVIII <sup>540-560</sup> -32	KSDPRCLTRYSSFV	269
FVIII <sup>540-560</sup> -33	KSDPRCLTRYSSFVN	270
FVIII <sup>540-560</sup> -34	KSDPRCLTRYSSFVNM	271
FVIII <sup>540-560</sup> -35	KSDPRCLTRYSSFVNME	272
FVIII <sup>540-560</sup> -36	KSDPRCLTRYSSFVNMER	273
FVIII <sup>540-560</sup> -37	SDPRCLTRY	274
FVIII <sup>540-560</sup> -38	SDPRCLTRY	275
FVIII <sup>540-560</sup> -39	SDPRCLTRYYS	276
FVIII <sup>540-560</sup> -40	SDPRCLTRYSS	277
FVIII <sup>540-560</sup> -41	SDPRCLTRYSSF	278
FVIII <sup>540-560</sup> -42	SDPRCLTRYSSFV	279
FVIII <sup>540-560</sup> -43	SDPRCLTRYSSFVN	280
FVIII <sup>540-560</sup> -44	SDPRCLTRYSSFVNM	281
FVIII <sup>540-560</sup> -45	SDPRCLTRYSSFVNME	282
FVIII <sup>540-560</sup> -46	SDPRCLTRYSSFVNMER	283
FVIII <sup>540-560</sup> -47	DPRCLTRY	284
FVIII <sup>540-560</sup> -48	DPRCLTRYYS	285

FVIII <sup>540-560</sup> -49	DPRCLTRYSS	286
FVIII <sup>540-560</sup> -50	DPRCLTRYSSF	287
FVIII <sup>540-560</sup> -51	DPRCLTRYSSFV	288
FVIII <sup>540-560</sup> -52	DPRCLTRYSSFVN	289
FVIII <sup>540-560</sup> -53	DPRCLTRYSSFVNM	290
FVIII <sup>540-560</sup> -54	DPRCLTRYSSFVNME	291
FVIII <sup>540-560</sup> -55	DPRCLTRYSSFVNMER	292
FVIII <sup>540-560</sup> -56	PRCLTRYSS	293
FVIII <sup>540-560</sup> -57	PRCLTRYSSF	294
FVIII <sup>540-560</sup> -58	PRCLTRYSSFV	295
FVIII <sup>540-560</sup> -59	PRCLTRYSSFVN	296
FVIII <sup>540-560</sup> -60	PRCLTRYSSFVNM	297
FVIII <sup>540-560</sup> -61	PRCLTRYSSFVNME	298
FVIII <sup>540-560</sup> -62	PRCLTRYSSFVNMER	299
FVIII <sup>540-560</sup> -63	RCLTRYSS	300
FVIII <sup>540-560</sup> -64	RCLTRYSSF	301
FVIII <sup>540-560</sup> -65	RCLTRYSSFV	302
FVIII <sup>540-560</sup> -66	RCLTRYSSFVN	303
FVIII <sup>540-560</sup> -67	RCLTRYSSFVNM	304
FVIII <sup>540-560</sup> -68	RCLTRYSSFVNME	305
FVIII <sup>540-560</sup> -69	RCLTRYSSFVNMER	306
FVIII <sup>540-560</sup> -70	CLTRYSSF	307
FVIII <sup>540-560</sup> -71	CLTRYSSFV	308
FVIII <sup>540-560</sup> -72	CLTRYSSFVN	309
FVIII <sup>540-560</sup> -73	CLTRYSSFVNM	310
FVIII <sup>540-560</sup> -74	CLTRYSSFVNME	311
FVIII <sup>540-560</sup> -75	CLTRYSSFVNMER	312
FVIII <sup>540-560</sup> -76	LTRYSSFV	313
FVIII <sup>540-560</sup> -77	LTRYSSFVN	314
FVIII <sup>540-560</sup> -78	LTRYSSFVNM	315
FVIII <sup>540-560</sup> -79	LTRYSSFVNME	316
FVIII <sup>540-560</sup> -80	LTRYSSFVNMER	317
FVIII <sup>540-560</sup> -81	TRYSSFVN	318
FVIII <sup>540-560</sup> -82	TRYSSFVNM	319
FVIII <sup>540-560</sup> -83	TRYSSFVNME	320
FVIII <sup>540-560</sup> -84	TRYSSFVNMER	321
FVIII <sup>540-560</sup> -85	RYSSFVN	322
FVIII <sup>540-560</sup> -86	RYSSFVNME	323
FVIII <sup>540-560</sup> -87	RYSSFVNMER	324
FVIII <sup>540-560</sup> -88	YSSFVN	325
FVIII <sup>540-560</sup> -89	YSSFVNME	326
FVIII <sup>540-560</sup> -90	YSSFVNMER	327
FVIII <sup>540-560</sup> -91	YSSFVNMER	328

E. Péptidos de factor VIII<sup>1401-1424</sup>

5 La presente invención proporciona un péptido tal como se define en las reivindicaciones 1-5. También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> que tiene la secuencia: QANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344),  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

10 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> que tiene la secuencia: QANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> que tiene la secuencia: QANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 329 a 464. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 329 a 464. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 329 a 464. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos

seleccionada de SEQ ID NO: 329 a 464. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

5 En una realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

20 En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

30 Tabla 6. Péptidos de FVIII<sup>1401-1424</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>1401-1424</sup> -1	QANRSPLPI	329
FVIII <sup>1401-1424</sup> -2	QANRSPLPIA	330
FVIII <sup>1401-1424</sup> -3	QANRSPLPIAK	331
FVIII <sup>1401-1424</sup> -4	QANRSPLPIAKV	332
FVIII <sup>1401-1424</sup> -5	QANRSPLPIAKVS	333
FVIII <sup>1401-1424</sup> -6	QANRSPLPIAKVSS	334
FVIII <sup>1401-1424</sup> -7	QANRSPLPIAKVSSF	335
FVIII <sup>1401-1424</sup> -8	QANRSPLPIAKVSSFP	336
FVIII <sup>1401-1424</sup> -9	QANRSPLPIAKVSSFPS	337
FVIII <sup>1401-1424</sup> -10	QANRSPLPIAKVSSFPSI	338
FVIII <sup>1401-1424</sup> -11	QANRSPLPIAKVSSFPSIR	339
FVIII <sup>1401-1424</sup> -12	QANRSPLPIAKVSSFPSIRP	340
FVIII <sup>1401-1424</sup> -13	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPI	341
FVIII <sup>1401-1424</sup> -14	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	342
FVIII <sup>1401-1424</sup> -15	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	343
FVIII <sup>1401-1424</sup> -16	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	344
FVIII <sup>1401-1424</sup> -17	ANRSPLPIA	345
FVIII <sup>1401-1424</sup> -18	ANRSPLPIAK	346
FVIII <sup>1401-1424</sup> -19	ANRSPLPIAKV	347
FVIII <sup>1401-1424</sup> -20	ANRSPLPIAKVS	348
FVIII <sup>1401-1424</sup> -21	ANRSPLPIAKVSS	349
FVIII <sup>1401-1424</sup> -22	ANRSPLPIAKVSSF	350
FVIII <sup>1401-1424</sup> -23	ANRSPLPIAKVSSFP	351
FVIII <sup>1401-1424</sup> -24	ANRSPLPIAKVSSFPS	352
FVIII <sup>1401-1424</sup> -25	ANRSPLPIAKVSSFPSI	353
FVIII <sup>1401-1424</sup> -26	ANRSPLPIAKVSSFPSIR	354
FVIII <sup>1401-1424</sup> -27	ANRSPLPIAKVSSFPSIRP	355
FVIII <sup>1401-1424</sup> -28	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPI	356
FVIII <sup>1401-1424</sup> -29	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	357
FVIII <sup>1401-1424</sup> -30	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	358
FVIII <sup>1401-1424</sup> -31	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	359
FVIII <sup>1401-1424</sup> -32	NRSPLPIAK	360

ES 2 639 039 T3

FVIII <sup>1401-1424</sup> -33	NRSPLPIAKV	361
FVIII <sup>1401-1424</sup> -34	NRSPLPIAKVS	362
FVIII <sup>1401-1424</sup> -35	NRSPLPIAKVSS	363
FVIII <sup>1401-1424</sup> -36	NRSPLPIAKVSSF	364
FVIII <sup>1401-1424</sup> -37	NRSPLPIAKVSSFP	365
FVIII <sup>1401-1424</sup> -38	NRSPLPIAKVSSFPS	366
FVIII <sup>1401-1424</sup> -39	NRSPLPIAKVSSFPSI	367
FVIII <sup>1401-1424</sup> -40	NRSPLPIAKVSSFPSIR	368
FVIII <sup>1401-1424</sup> -41	NRSPLPIAKVSSFPSIRP	369
FVIII <sup>1401-1424</sup> -42	NRSPLPIAKVSSFPSIRPI	370
FVIII <sup>1401-1424</sup> -43	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	371
FVIII <sup>1401-1424</sup> -44	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	372
FVIII <sup>1401-1424</sup> -45	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	373
FVIII <sup>1401-1424</sup> -46	RSPLPIAKV	374
FVIII <sup>1401-1424</sup> -47	RSPLPIAKVVS	375
FVIII <sup>1401-1424</sup> -48	RSPLPIAKVSS	376
FVIII <sup>1401-1424</sup> -49	RSPLPIAKVSSF	377
FVIII <sup>1401-1424</sup> -50	RSPLPIAKVSSFP	378
FVIII <sup>1401-1424</sup> -51	RSPLPIAKVSSFPS	379
FVIII <sup>1401-1424</sup> -52	RSPLPIAKVSSFPSI	380
FVIII <sup>1401-1424</sup> -53	RSPLPIAKVSSFPSIR	381
FVIII <sup>1401-1424</sup> -54	RSPLPIAKVSSFPSIRP	382
FVIII <sup>1401-1424</sup> -55	RSPLPIAKVSSFPSIRPI	383
FVIII <sup>1401-1424</sup> -56	RSPLPIAKVSSFPSIRPIY	384
FVIII <sup>1401-1424</sup> -57	RSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	385
FVIII <sup>1401-1424</sup> -58	RSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	386
FVIII <sup>1401-1424</sup> -59	SPLPIAKVS	387
FVIII <sup>1401-1424</sup> -60	SPLPIAKVSS	388
FVIII <sup>1401-1424</sup> -61	SPLPIAKVSSF	389
FVIII <sup>1401-1424</sup> -62	SPLPIAKVSSFP	390
FVIII <sup>1401-1424</sup> -63	SPLPIAKVSSFPS	391
FVIII <sup>1401-1424</sup> -64	SPLPIAKVSSFPSI	392
FVIII <sup>1401-1424</sup> -65	SPLPIAKVSSFPSIR	393
FVIII <sup>1401-1424</sup> -66	SPLPIAKVSSFPSIRP	394
FVIII <sup>1401-1424</sup> -67	SPLPIAKVSSFPSIRPI	395
FVIII <sup>1401-1424</sup> -68	SPLPIAKVSSFPSIRPIY	396
FVIII <sup>1401-1424</sup> -69	SPLPIAKVSSFPSIRPIYL	397
FVIII <sup>1401-1424</sup> -70	SPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	398
FVIII <sup>1401-1424</sup> -71	PLPIAKVSS	399
FVIII <sup>1401-1424</sup> -72	PLPIAKVSSF	400
FVIII <sup>1401-1424</sup> -73	PLPIAKVSSFP	401
FVIII <sup>1401-1424</sup> -74	PLPIAKVSSFPS	402
FVIII <sup>1401-1424</sup> -75	PLPIAKVSSFPSI	403
FVIII <sup>1401-1424</sup> -76	PLPIAKVSSFPSIR	404
FVIII <sup>1401-1424</sup> -77	PLPIAKVSSFPSIRP	405
FVIII <sup>1401-1424</sup> -78	PLPIAKVSSFPSIRPI	406
FVIII <sup>1401-1424</sup> -79	PLPIAKVSSFPSIRPIY	407
FVIII <sup>1401-1424</sup> -80	PLPIAKVSSFPSIRPIYL	408
FVIII <sup>1401-1424</sup> -81	PLPIAKVSSFPSIRPIYLT	409
FVIII <sup>1401-1424</sup> -82	LPIAKVSSF	410
FVIII <sup>1401-1424</sup> -83	LPIAKVSSFP	411
FVIII <sup>1401-1424</sup> -84	LPIAKVSSFPS	412
FVIII <sup>1401-1424</sup> -85	LPIAKVSSFPSI	413
FVIII <sup>1401-1424</sup> -86	LPIAKVSSFPSIR	414
FVIII <sup>1401-1424</sup> -87	LPIAKVSSFPSIRP	415
FVIII <sup>1401-1424</sup> -88	LPIAKVSSFPSIRPI	416
FVIII <sup>1401-1424</sup> -89	LPIAKVSSFPSIRPIY	417
FVIII <sup>1401-1424</sup> -90	LPIAKVSSFPSIRPIYL	418
FVIII <sup>1401-1424</sup> -91	LPIAKVSSFPSIRPIYLT	419
FVIII <sup>1401-1424</sup> -92	PIAKVSSFP	420
FVIII <sup>1401-1424</sup> -93	PIAKVSSFPS	421
FVIII <sup>1401-1424</sup> -94	PIAKVSSFPSI	422
FVIII <sup>1401-1424</sup> -95	PIAKVSSFPSIR	423

FVIII <sup>1401-1424</sup> -96	PIAKVSSFPSIRP	424
FVIII <sup>1401-1424</sup> -97	PIAKVSSFPSIRPI	425
FVIII <sup>1401-1424</sup> -98	PIAKVSSFPSIRPIY	426
FVIII <sup>1401-1424</sup> -99	PIAKVSSFPSIRPIYL	427
FVIII <sup>1401-1424</sup> -100	PIAKVSSFPSIRPIYLT	428
FVIII <sup>1401-1424</sup> -101	IAKVSSFPS	429
FVIII <sup>1401-1424</sup> -102	IAKVSSFPSI	430
FVIII <sup>1401-1424</sup> -103	IAKVSSFPSIR	431
FVIII <sup>1401-1424</sup> -104	IAKVSSFPSIRP	432
FVIII <sup>1401-1424</sup> -105	IAKVSSFPSIRPI	433
FVIII <sup>1401-1424</sup> -106	IAKVSSFPSIRPIY	434
FVIII <sup>1401-1424</sup> -107	IAKVSSFPSIRPIYL	435
FVIII <sup>1401-1424</sup> -108	IAKVSSFPSIRPIYLT	436
FVIII <sup>1401-1424</sup> -109	AKVSSFPSI	437
FVIII <sup>1401-1424</sup> -110	AKVSSFPSIR	438
FVIII <sup>1401-1424</sup> -111	AKVSSFPSIRP	439
FVIII <sup>1401-1424</sup> -112	AKVSSFPSIRPI	440
FVIII <sup>1401-1424</sup> -113	AKVSSFPSIRPIY	441
FVIII <sup>1401-1424</sup> -114	AKVSSFPSIRPIYL	442
FVIII <sup>1401-1424</sup> -115	AKVSSFPSIRPIYLT	443
FVIII <sup>1401-1424</sup> -116	KVSSFPSIR	444
FVIII <sup>1401-1424</sup> -117	KVSSFPSIRP	445
FVIII <sup>1401-1424</sup> -118	KVSSFPSIRPI	446
FVIII <sup>1401-1424</sup> -119	KVSSFPSIRPIY	447
FVIII <sup>1401-1424</sup> -120	KVSSFPSIRPIYL	448
FVIII <sup>1401-1424</sup> -121	KVSSFPSIRPIYLT	449
FVIII <sup>1401-1424</sup> -122	VSSFPSIRP	450
FVIII <sup>1401-1424</sup> -123	VSSFPSIRPI	451
FVIII <sup>1401-1424</sup> -124	VSSFPSIRPIY	452
FVIII <sup>1401-1424</sup> -125	VSSFPSIRPIYL	453
FVIII <sup>1401-1424</sup> -126	VSSFPSIRPIYLT	454
FVIII <sup>1401-1424</sup> -127	SSFPSIRPI	455
FVIII <sup>1401-1424</sup> -128	SSFPSIRPIY	456
FVIII <sup>1401-1424</sup> -129	SSFPSIRPIYL	457
FVIII <sup>1401-1424</sup> -130	SSFPSIRPIYLT	458
FVIII <sup>1401-1424</sup> -131	SFPSIRPIY	459
FVIII <sup>1401-1424</sup> -132	SFPSIRPTYL	460
FVIII <sup>1401-1424</sup> -133	SFPSIRPIYLT	461
FVIII <sup>1401-1424</sup> -134	FPSIRPIYL	462
FVIII <sup>1401-1424</sup> -135	FPSIRPIYLT	463
FVIII <sup>1401-1424</sup> -136	PSIRPIYLT	464

F. Péptidos de factor VIII<sup>1785-1805</sup>

5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1785-1805</sup> que tiene la secuencia: EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477),  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1785-1805</sup> que tiene la secuencia: EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477).

15 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1785-1805</sup> que tiene la secuencia: EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 465 a 555. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 465 a 555. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 465 a 555. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 465 a 555. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

En una realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Tabla 7. Péptidos de FVIII<sup>1785-1805</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>1785-1805</sup> -1	EVEDNIMVT	465
FVIII <sup>1785-1805</sup> -2	EVEDNIMVTF	466
FVIII <sup>1785-1805</sup> -3	EVEDNIMVTFR	467
FVIII <sup>1785-1805</sup> -4	EVEDNIMVTFRN	468
FVIII <sup>1785-1805</sup> -5	EVEDNIMVTFRNQ	469
FVIII <sup>1785-1805</sup> -6	EVEDNIMVTFRNQA	470
FVIII <sup>1785-1805</sup> -7	EVEDNIMVTFRNQAS	471
FVIII <sup>1785-1805</sup> -8	EVEDNIMVTFRNQASR	472
FVIII <sup>1785-1805</sup> -9	EVEDNIMVTFRNQASRP	473
FVIII <sup>1785-1805</sup> -10	EVEDNIMVTFRNQASRPY	474
FVIII <sup>1785-1805</sup> -11	EVEDNIMVTFRNQASRPYS	475
FVIII <sup>1785-1805</sup> -12	EVEDNIMVTFRNQASRPYSF	476
FVIII <sup>1785-1805</sup> -13	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY	477
FVIII <sup>1785-1805</sup> -14	VEDNIMVTF	478
FVIII <sup>1785-1805</sup> -15	VEDNIMVTFR	479
FVIII <sup>1785-1805</sup> -16	VEDNIMVTFRN	480
FVIII <sup>1785-1805</sup> -17	VEDNIMVTFRNQ	481
FVIII <sup>1785-1805</sup> -18	VEDNIMVTFRNQA	482
FVIII <sup>1785-1805</sup> -19	VEDNIMVTFRNQAS	483
FVIII <sup>1785-1805</sup> -20	VEDNIMVTFRNQASR	484
FVIII <sup>1785-1805</sup> -21	VEDNIMVTFRNQASRP	485
FVIII <sup>1785-1805</sup> -22	VEDNIMVTFRNQASRPY	486
FVIII <sup>1785-1805</sup> -23	VEDNIMVTFRNQASRPYS	487
FVIII <sup>1785-1805</sup> -24	VEDNIMVTFRNQASRPYSF	488
FVIII <sup>1785-1805</sup> -25	VEDNIMVTFRNQASRPYSFY	489
FVIII <sup>1785-1805</sup> -26	EDNIMVTFR	490
FVIII <sup>1785-1805</sup> -27	EDNIMVTFRN	491
FVIII <sup>1785-1805</sup> -28	EDNIMVTFRNQ	492
FVIII <sup>1785-1805</sup> -29	EDNIMVTFRNQA	493
FVIII <sup>1785-1805</sup> -30	EDNIMVTFRNQAS	494
FVIII <sup>1785-1805</sup> -31	EDNIMVTFRNQASR	495
FVIII <sup>1785-1805</sup> -32	EDNIMVTFRNQASRP	496
FVIII <sup>1785-1805</sup> -33	EDNIMVTFRNQASRPY	497
FVIII <sup>1785-1805</sup> -34	EDNIMVTFRNQASRPYS	498
FVIII <sup>1785-1805</sup> -35	EDNIMVTFRNQASRPYSF	499

FVIII <sup>1785-1805</sup> -36	EDNIMVTFRNQASRPYSFY	500
FVIII <sup>1785-1805</sup> -37	DNIMVTFRN	501
FVIII <sup>1785-1805</sup> -38	DNIMVTFRNQ	502
FVIII <sup>1785-1805</sup> -39	DNIMVTFRNQQA	503
FVIII <sup>1785-1805</sup> -40	DNIMVTFRNQAS	504
FVIII <sup>1785-1805</sup> -41	DNIMVTFRNQASR	505
FVIII <sup>1785-1805</sup> -42	DNIMVTFRNQASRP	506
FVIII <sup>1785-1805</sup> -43	DNIMVTFRNQASRPY	507
FVIII <sup>1785-1805</sup> -44	DNIMVTFRNQASRPYS	508
FVIII <sup>1785-1805</sup> -45	DNIMVTFRNQASRPYSF	509
FVIII <sup>1785-1805</sup> -46	DNIMVTFRNQASRPYSFY	510
FVIII <sup>1785-1805</sup> -47	NIMVTFRNQ	511
FVIII <sup>1785-1805</sup> -48	NIMVTFRNQQA	512
FVIII <sup>1785-1805</sup> -49	NIMVTFRNQAS	513
FVIII <sup>1785-1805</sup> -50	NIMVTFRNQASR	514
FVIII <sup>1785-1805</sup> -51	NIMVTFRNQASRP	515
FVIII <sup>1785-1805</sup> -52	NIMVTFRNQASRPY	516
FVIII <sup>1785-1805</sup> -53	NIMVTFRNQASRPYS	517
FVIII <sup>1785-1805</sup> -54	NIMVTFRNQASRPYSF	518
FVIII <sup>1785-1805</sup> -55	NIMVTFRNQASRPYSFY	519
FVIII <sup>1785-1805</sup> -56	IMVTFRNQQA	520
FVIII <sup>1785-1805</sup> -57	IMVTFRNQAS	521
FVIII <sup>1785-1805</sup> -58	IMVTFRNQASR	522
FVIII <sup>1785-1805</sup> -59	IMVTFRNQASRP	523
FVIII <sup>1785-1805</sup> -60	IMVTFRNQASRPY	524
FVIII <sup>1785-1805</sup> -61	IMVTFRNQASRPYS	525
FVIII <sup>1785-1805</sup> -62	IMVTFRNQASRPYSF	526
FVIII <sup>1785-1805</sup> -63	IMVTFRNQASRPYSFY	527
FVIII <sup>1785-1805</sup> -64	MVTFRNQAS	528
FVIII <sup>1785-1805</sup> -65	MVTFRNQASR	529
FVIII <sup>1785-1805</sup> -66	MVTFRNQASRP	530
FVIII <sup>1785-1805</sup> -67	MVTFRNQASRPY	531
FVIII <sup>1785-1805</sup> -68	MVTFRNQASRPYS	532
FVIII <sup>1785-1805</sup> -69	MVTFRNQASRPYSF	533
FVIII <sup>1785-1805</sup> -70	MVTFRNQASRPYSFY	534
FVIII <sup>1785-1805</sup> -71	VTFRNQASR	535
FVIII <sup>1785-1805</sup> -72	VTFRNQASRP	536
FVIII <sup>1785-1805</sup> -73	VTFRNQASRPY	537
FVIII <sup>1785-1805</sup> -74	VTFRNQASRPYS	538
FVIII <sup>1785-1805</sup> -75	VTFRNQASRPYSF	539
FVIII <sup>1785-1805</sup> -76	VTFRNQASRPYSFY	540
FVIII <sup>1785-1805</sup> -77	TFRNQASRP	541
FVIII <sup>1785-1805</sup> -78	TFRNQASRPY	542
FVIII <sup>1785-1805</sup> -79	TFRNQASRPYS	543
FVIII <sup>1785-1805</sup> -80	TFRNQASRPYSF	544
FVIII <sup>1785-1805</sup> -81	TFRNQASRPYSFY	545
FVIII <sup>1785-1805</sup> -82	FRNQASRPY	546
FVIII <sup>1785-1805</sup> -83	FRNQASRPYS	547
FVIII <sup>1785-1805</sup> -84	FRNQASRPYSF	548
FVIII <sup>1785-1805</sup> -85	FRNQASRPYSFY	549
FVIII <sup>1785-1805</sup> -86	RNQASRPYS	550
FVIII <sup>1785-1805</sup> -87	RNQASRPYSF	551
FVIII <sup>1785-1805</sup> -88	RNQASRPYSFY	552
FVIII <sup>1785-1805</sup> -89	NQASRPYSF	553
FVIII <sup>1785-1805</sup> -90	NQASRPYSFY	554
FVIII <sup>1785-1805</sup> -91	QASRPYSFY	555

#### G. Péptidos de factor VIII<sup>2025-2045</sup>

- 5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>, en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>2025-2045</sup> que tiene la secuencia: LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1

hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

5 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>2025-2045</sup> que tiene la secuencia: LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>2025-2045</sup> que tiene la secuencia: LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568). En una  
10 realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 556 a 646. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 556 a 646. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 556 a 646. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras  
15 realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

20 En una realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra  
25 realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,  
30 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

35 En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85,  
40 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Tabla 8. Péptidos de FVIII<sup>2025-2045</sup> a modo de ejemplo

	Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -1	LHAGMSTLF	556
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -2	LHAGMSTLFL	557
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -3	LHAGMSTLFLV	558
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -4	LHAGMSTLFLVY	559
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -5	LHAGMSTLFLVYS	560
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -6	LHAGMSTLFLVYSN	561
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -7	LHAGMSTLFLVYSNK	562
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -8	LHAGMSTLFLVYSNKC	563
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -9	LHAGMSTLFLVYSNKCQ	564
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -10	LHAGMSTLFLVYSNKCQT	565
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -11	LHAGMSTLFLVYSNKCQTP	566
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -12	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPL	567
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -13	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG	568
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -14	HAGMSTLFL	569
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -15	HAGMSTLFLV	570
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -16	HAGMSTLFLVY	571
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -17	HAGMSTLFLVYS	572
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -18	HAGMSTLFLVYSN	573
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -19	HAGMSTLFLVYSNK	574
	FVIII <sup>2025-2045</sup> -20	HAGMSTLFLVYSNKC	575

ES 2 639 039 T3

FVIII <sup>2025-2045</sup> -21	HAGMSTFLVYSNKCQ	576
FVIII <sup>2025-2045</sup> -22	HAGMSTFLVYSNKCQT	577
FVIII <sup>2025-2045</sup> -23	HAGMSTFLVYSNKCQTP	578
FVIII <sup>2025-2045</sup> -24	HAGMSTFLVYSNKCQTPL	579
FVIII <sup>2025-2045</sup> -25	HAGMSTFLVYSNKCQTPLG	580
FVIII <sup>2025-2045</sup> -26	AGMSTFLV	581
FVIII <sup>2025-2045</sup> -27	AGMSTFLVY	582
FVIII <sup>2025-2045</sup> -28	AGMSTFLVYS	583
FVIII <sup>2025-2045</sup> -29	AGMSTFLVYSN	584
FVIII <sup>2025-2045</sup> -30	AGMSTFLVYSNK	585
FVIII <sup>2025-2045</sup> -31	AGMSTFLVYSNKC	586
FVIII <sup>2025-2045</sup> -32	AGMSTFLVYSNKCQ	587
FVIII <sup>2025-2045</sup> -33	AGMSTFLVYSNKCQT	588
FVIII <sup>2025-2045</sup> -34	AGMSTFLVYSNKCQTP	589
FVIII <sup>2025-2045</sup> -35	AGMSTFLVYSNKCQTPL	590
FVIII <sup>2025-2045</sup> -36	AGMSTFLVYSNKCQTPLG	591
FVIII <sup>2025-2045</sup> -37	GMSTFLVY	592
FVIII <sup>2025-2045</sup> -38	GMSTFLVYS	593
FVIII <sup>2025-2045</sup> -39	GMSTFLVYSN	594
FVIII <sup>2025-2045</sup> -40	GMSTFLVYSNK	595
FVIII <sup>2025-2045</sup> -41	GMSTFLVYSNKC	596
FVIII <sup>2025-2045</sup> -42	GMSTFLVYSNKCQ	597
FVIII <sup>2025-2045</sup> -43	GMSTFLVYSNKCQT	598
FVIII <sup>2025-2045</sup> -44	GMSTFLVYSNKCQTP	599
FVIII <sup>2025-2045</sup> -45	GMSTFLVYSNKCQTPL	600
FVIII <sup>2025-2045</sup> -46	GMSTFLVYSNKCQTPLG	601
FVIII <sup>2025-2045</sup> -47	MSTFLVYS	602
FVIII <sup>2025-2045</sup> -48	MSTFLVYSN	603
FVIII <sup>2025-2045</sup> -49	MSTFLVYSNK	604
FVIII <sup>2025-2045</sup> -50	MSTFLVYSNKC	605
FVIII <sup>2025-2045</sup> -51	MSTFLVYSNKCQ	606
FVIII <sup>2025-2045</sup> -52	MSTFLVYSNKCQT	607
FVIII <sup>2025-2045</sup> -53	MSTFLVYSNKCQTP	608
FVIII <sup>2025-2045</sup> -54	MSTFLVYSNKCQTPL	609
FVIII <sup>2025-2045</sup> -55	MSTFLVYSNKCQTPLG	610
FVIII <sup>2025-2045</sup> -56	STFLVYSN	611
FVIII <sup>2025-2045</sup> -57	STFLVYSNK	612
FVIII <sup>2025-2045</sup> -58	STFLVYSNKC	613
FVIII <sup>2025-2045</sup> -59	STFLVYSNKCQ	614
FVIII <sup>2025-2045</sup> -60	STFLVYSNKCQT	615
FVIII <sup>2025-2045</sup> -61	STFLVYSNKCQTP	616
FVIII <sup>2025-2045</sup> -62	STFLVYSNKCQTPL	617
FVIII <sup>2025-2045</sup> -63	STFLVYSNKCQTPLG	618
FVIII <sup>2025-2045</sup> -64	TLFLVYSNK	619
FVIII <sup>2025-2045</sup> -65	TLFLVYSNKC	620
FVIII <sup>2025-2045</sup> -66	TLFLVYSNKCQ	621
FVIII <sup>2025-2045</sup> -67	TLFLVYSNKCQT	622
FVIII <sup>2025-2045</sup> -68	TLFLVYSNKCQTP	623
FVIII <sup>2025-2045</sup> -69	TLFLVYSNKCQTPL	624
FVIII <sup>2025-2045</sup> -70	TLFLVYSNKCQTPLG	625
FVIII <sup>2025-2045</sup> -71	LFLVYSNKC	626
FVIII <sup>2025-2045</sup> -72	LFLVYSNKCQ	627
FVIII <sup>2025-2045</sup> -73	LFLVYSNKCQT	628
FVIII <sup>2025-2045</sup> -74	LFLVYSNKCQTP	629
FVIII <sup>2025-2045</sup> -75	LFLVYSNKCQTPL	630
FVIII <sup>2025-2045</sup> -76	LFLVYSNKCQTPLG	631
FVIII <sup>2025-2045</sup> -77	FLVYSNKCQ	632
FVIII <sup>2025-2045</sup> -78	FLVYSNKCQT	633
FVIII <sup>2025-2045</sup> -79	FLVYSNKCQTP	634
FVIII <sup>2025-2045</sup> -80	FLVYSNKCQTPL	635
FVIII <sup>2025-2045</sup> -81	FLVYSNKCQTPLG	636
FVIII <sup>2025-2045</sup> -82	LVYSNKCQT	637
FVIII <sup>2025-2045</sup> -83	LVYSNKCQTP	638

FVIII <sup>2025-2045</sup> -84	LVYSNKCQTPL	639
FVIII <sup>2025-2045</sup> -85	LVYSNKCQTPLG	640
FVIII <sup>2025-2045</sup> -86	VYSNKCQTP	641
FVIII <sup>2025-2045</sup> -87	VYSNKCQTPL	642
FVIII <sup>2025-2045</sup> -88	VYSNKCQTPLG	643
FVIII <sup>2025-2045</sup> -89	YSNKCQTPL	644
FVIII <sup>2025-2045</sup> -90	YSNKCQTPLG	645
FVIII <sup>2025-2045</sup> -91	SNKCQTPLG	646

H. Péptidos de factor VIII<sup>2160-2180</sup>

5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>2160-2180</sup> que tiene la secuencia: NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO: 659), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

10 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>2160-2180</sup> que tiene la secuencia: NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO: 659). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>2160-2180</sup> que tiene la secuencia: NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO: 659). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 647 a 737. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 647 a 737. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 647 a 737. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 647 a 737. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

25 En una realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

40 En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

50 Tabla 9. Péptidos de FVIII<sup>2160-2180</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>2160-2180</sup> -1	NPPIIARYI	647
FVIII <sup>2160-2180</sup> -2	NPPIIARYIR	648
FVIII <sup>2160-2180</sup> -3	NPPIIARYIRL	649
FVIII <sup>2160-2180</sup> -4	NPPIIARYIRLH	650
FVIII <sup>2160-2180</sup> -5	NPPIIARYIRLHP	651

ES 2 639 039 T3

FVIII <sup>2160-2180</sup> -6	NPPIIARYIRLHPT	652
FVIII <sup>2160-2180</sup> -7	NPPIIARYIRLHPH	653
FVIII <sup>2160-2180</sup> -8	NPPIIARYIRLHPHXY	654
FVIII <sup>2160-2180</sup> -9	NPPIIARYIRLHPHYS	655
FVIII <sup>2160-2180</sup> -10	NPPIIARYIRLHPHYSI	656
FVIII <sup>2160-2180</sup> -11	NPPIIARYIRLHPHYSIR	657
FVIII <sup>2160-2180</sup> -12	NPPIIARYIRLHPHYSIRS	658
FVIII <sup>2160-2180</sup> -13	NPPIIARYIRLHPHYSIRST	659
FVIII <sup>2160-2180</sup> -14	PPIIARYIR	660
FVIII <sup>2160-2180</sup> -15	PPIIARYIRL	661
FVIII <sup>2160-2180</sup> -16	PPIIARYIRLH	662
FVIII <sup>2160-2180</sup> -17	PPIIARYIRLHP	663
FVIII <sup>2160-2180</sup> -18	PPIIARYIRLHPT	664
FVIII <sup>2160-2180</sup> -19	PPIIARYIRLHPH	665
FVIII <sup>2160-2180</sup> -20	PPIIARYIRLHPHXY	666
FVIII <sup>2160-2180</sup> -21	PPIIARYIRLHPHYS	667
FVIII <sup>2160-2180</sup> -22	PPIIARYIRLHPHYSI	668
FVIII <sup>2160-2180</sup> -23	PPIIARYIRLHPHYSIR	669
FVIII <sup>2160-2180</sup> -24	PPIIARYIRLHPHYSIRS	670
FVIII <sup>2160-2180</sup> -25	PPIIARYIRLHPHYSIRST	671
FVIII <sup>2160-2180</sup> -26	PIIARYIRL	672
FVIII <sup>2160-2180</sup> -27	PIIARYIRLH	673
FVIII <sup>2160-2180</sup> -28	PIIARYIRLHP	674
FVIII <sup>2160-2180</sup> -29	PIIARYIRLHPT	675
FVIII <sup>2160-2180</sup> -30	PIIARYIRLHPH	676
FVIII <sup>2160-2180</sup> -31	PIIARYIRLHPHXY	677
FVIII <sup>2160-2180</sup> -32	PIIARYIRLHPHYS	678
FVIII <sup>2160-2180</sup> -33	PIIARYIRLHPHYSI	679
FVIII <sup>2160-2180</sup> -34	PIIARYIRLHPHYSIR	680
FVIII <sup>2160-2180</sup> -35	PIIARYIRLHPHYSIRS	681
FVIII <sup>2160-2180</sup> -36	PIIARYIRLHPHYSIRST	682
FVIII <sup>2160-2180</sup> -37	IIARYIRLH	683
FVIII <sup>2160-2180</sup> -38	IIARYIRLHP	684
FVIII <sup>2160-2180</sup> -39	IIARYIRLHPT	685
FVIII <sup>2160-2180</sup> -40	IIARYIRLHPH	686
FVIII <sup>2160-2180</sup> -41	IIARYIRLHPHXY	687
FVIII <sup>2160-2180</sup> -42	IIARYIRLHPHYS	688
FVIII <sup>2160-2180</sup> -43	IIARYIRLHPHYSI	689
FVIII <sup>2160-2180</sup> -44	IIARYIRLHPHYSIR	690
FVIII <sup>2160-2180</sup> -45	IIARYIRLHPHYSIRS	691
FVIII <sup>2160-2180</sup> -46	IIARYIRLHPHYSIRST	692
FVIII <sup>2160-2180</sup> -47	IARYIRLHP	693
FVIII <sup>2160-2180</sup> -48	IARYIRLHPT	694
FVIII <sup>2160-2180</sup> -49	IARYIRLHPH	695
FVIII <sup>2160-2180</sup> -50	IARYIRLHPHXY	696
FVIII <sup>2160-2180</sup> -51	IARYIRLHPHYS	697
FVIII <sup>2160-2180</sup> -52	IARYIRLHPHYSI	698
FVIII <sup>2160-2180</sup> -53	IARYIRLHPHYSIR	699
FVIII <sup>2160-2180</sup> -54	IARYIRLHPHYSIRS	700
FVIII <sup>2160-2180</sup> -55	IARYIRLHPHYSIRST	701
FVIII <sup>2160-2180</sup> -56	ARYIRLHPT	702
FVIII <sup>2160-2180</sup> -57	ARYIRLHPH	703
FVIII <sup>2160-2180</sup> -58	ARYIRLHPHXY	704
FVIII <sup>2160-2180</sup> -59	ARYIRLHPHYS	705
FVIII <sup>2160-2180</sup> -60	ARYIRLHPHYSI	706
FVIII <sup>2160-2180</sup> -61	ARYIRLHPHYSIR	707
FVIII <sup>2160-2180</sup> -62	ARYIRLHPHYSIRS	708
FVIII <sup>2160-2180</sup> -63	ARYIRLHPHYSIRST	709
FVIII <sup>2160-2180</sup> -64	RYIRLHPH	710
FVIII <sup>2160-2180</sup> -65	RYIRLHPHXY	711
FVIII <sup>2160-2180</sup> -66	RYIRLHPHYS	712
FVIII <sup>2160-2180</sup> -67	RYIRLHPHYSI	713
FVIII <sup>2160-2180</sup> -68	RYIRLHPHYSIR	714

FVIII <sup>2160-2180</sup> -69	RYIRLHPHYSIRS	715
FVIII <sup>2160-2180</sup> -70	RYIRLHPHYSIRST	716
FVIII <sup>2160-2180</sup> -71	YIRLHPHY	717
FVIII <sup>2160-2180</sup> -72	YIRLHPHYS	718
FVIII <sup>2160-2180</sup> -73	YIRLHPHYSI	719
FVIII <sup>2160-2180</sup> -74	YIRLHPHYSIR	720
FVIII <sup>2160-2180</sup> -75	YIRLHPHYSIRS	721
FVIII <sup>2160-2180</sup> -76	YIRLHPHYSIRST	722
FVIII <sup>2160-2180</sup> -77	IRLHPHYS	723
FVIII <sup>2160-2180</sup> -78	IRLHPHYSI	724
FVIII <sup>2160-2180</sup> -79	IRLHPHYSIR	725
FVIII <sup>2160-2180</sup> -80	IRLHPHYSIRS	726
FVIII <sup>2160-2180</sup> -81	IRLHPHYSIRST	727
FVIII <sup>2160-2180</sup> -82	RLHPHYSI	728
FVIII <sup>2160-2180</sup> -83	RLHPHYSIR	729
FVIII <sup>2160-2180</sup> -84	RLHPHYSIRS	730
FVIII <sup>2160-2180</sup> -85	RLHPHYSIRST	731
FVIII <sup>2160-2180</sup> -86	LHPHYSIR	732
FVIII <sup>2160-2180</sup> -87	LHPHYSIRS	733
FVIII <sup>2160-2180</sup> -88	LHPHYSIRST	734
FVIII <sup>2160-2180</sup> -89	HPTHYSIRS	735
FVIII <sup>2160-2180</sup> -90	HPTHYSIRST	736
FVIII <sup>2160-2180</sup> -91	PTHYSIRST	737

#### I. Péptidos de factor VIII<sup>102-122</sup>

5 También se proporciona en el presente documento un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>102-122</sup> que tiene la secuencia: TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740),  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno.

10 En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>102-122</sup> que tiene la secuencia: TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740). En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>102-122</sup> que tiene la secuencia: TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740).

15 En el contexto de la presente invención, los péptidos de FVIII<sup>102-122</sup> también incluyen péptidos de FVIII<sup>102-119</sup>. Por consiguiente, en una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 a 55 y 738 a 773. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 a 55 y 738 a 773. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 a 55 y 738 a 773. En una realización, P es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1 a 55 y 738 a 773. En algunas realizaciones, tanto x como y pueden ser cero. En otras realizaciones, x puede ser uno e y puede ser cero. En otras realizaciones, x puede ser cero e y puede ser uno. En aún otra realización más, tanto x como y pueden ser uno.

20 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

10 Tabla 10. Péptidos de FVIII<sup>102-122</sup> a modo de ejemplo

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
FVIII <sup>102-122</sup> -738	TVVITLKNMASHPVSLHAV	738
FVIII <sup>102-122</sup> -739	TVVITLKNMASHPVSLHAVG	739
FVIII <sup>102-122</sup> -740	TVVITLKNMASHPVSLHAVGV	740
FVIII <sup>102-122</sup> -741	VVITLKNMASHPVSLHAV	741
FVIII <sup>102-122</sup> -742	VVITLKNMASHPVSLHAVG	742
FVIII <sup>102-122</sup> -743	VVITLKNMASHPVSLHAVGV	743
FVIII <sup>102-122</sup> -744	VITLKNMASHPVSLHAV	744
FVIII <sup>102-122</sup> -745	VITLKNMASHPVSLHAVG	745
FVIII <sup>102-122</sup> -746	VITLKNMASHPVSLHAVGV	746
FVIII <sup>102-122</sup> -747	ITLKNMASHPVSLHAV	747
FVIII <sup>102-122</sup> -748	ITLKNMASHPVSLHAVG	748
FVIII <sup>102-122</sup> -749	ITLKNMASHPVSLHAVGV	749
FVIII <sup>102-122</sup> -750	TLKNMASHPVSLHAV	750
FVIII <sup>102-122</sup> -751	TLKNMASHPVSLHAVG	751
FVIII <sup>102-122</sup> -752	TLKNMASIIPVSLIHAVGV	752
FVIII <sup>102-122</sup> -753	LKNMASHPVSLHAV	753
FVIII <sup>102-122</sup> -754	LKNMASHPVSLHAVG	754
FVIII <sup>102-122</sup> -755	LKNMASHPVSLHAVGV	755
FVIII <sup>102-122</sup> -756	KNMASHPVSLHAV	756
FVIII <sup>102-122</sup> -757	KNMASHPVSLHAVG	757
FVIII <sup>102-122</sup> -758	KNMASHPVSLHAVGV	758
FVIII <sup>102-122</sup> -759	NMASHPVSLHAV	759
FVIII <sup>102-122</sup> -760	NMASHPVSLHAVG	760
FVIII <sup>102-122</sup> -761	NMASHPVSLHAVGV	761
FVIII <sup>102-122</sup> -762	MASHPVSLHAV	762
FVIII <sup>102-122</sup> -763	MASHPVSLHAVG	763
FVIII <sup>102-122</sup> -764	MASHPVSLHAVGV	764
FVIII <sup>102-122</sup> -765	ASHPVSLHAV	765
FVIII <sup>102-122</sup> -766	ASHPVSLHAVG	766
FVIII <sup>102-122</sup> -767	ASHPVSLHAVGV	767
FVIII <sup>102-122</sup> -768	SHPVSLHAV	768
FVIII <sup>102-122</sup> -769	SHPVSLHAVG	769
FVIII <sup>102-122</sup> -770	SHPVSLHAVGV	770
FVIII <sup>102-122</sup> -771	HPVSLHAVG	771
FVIII <sup>102-122</sup> -772	HPVSLHAVGV	772
FVIII <sup>102-122</sup> -773	PVSLHAVGV	773

#### IV. Métodos de producción de péptidos de FVIII

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere además a métodos para producir péptidos de FVIII. En algunas realizaciones, los péptidos de FVIII de la presente invención pueden producirse usando técnicas de síntesis en fase sólida (por ejemplo, Fmoc o t-Boc) o líquida generalmente conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Chan & White, Eds., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis (CRC Press, 2005); Howl, Peptide Synthesis and Applications (Humana Press, 2010).

20 Se divulga en el presente documento un método de preparación de un péptido de FVIII, comprendiendo el método:  
a) sintetizar un péptido usando técnicas de síntesis en fase sólida o fase líquida, teniendo el péptido de FVIII la secuencia: (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>, en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68, 344 y 740, R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es

independientemente cero o uno. En una realización,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En determinadas realizaciones, los péptidos pueden cubrir todo el dominio B de la proteína FVIII humana.

5 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambos secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

20 En otras realizaciones, los péptidos pueden producirse usando técnicas recombinantes. Se divulga en el presente documento un método de preparación de un péptido de FVIII, comprendiendo el método las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un vector que codifica un péptido de FVIII, teniendo el péptido de FVIII la secuencia:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68, 344 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno. En una realización,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En determinadas realizaciones, los péptidos pueden cubrir el dominio B completo de la proteína FVIII humana.

35 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

50 La presente invención proporciona un método según la reivindicación 20. La presente divulgación también proporciona un método para producir un péptido de FVIII, comprendiendo el método las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de FVIII, teniendo el péptido la secuencia:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y son independientemente cero o uno; y b) expresar el péptido en el cultivo de células.

60 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos

que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

En una realización de los métodos para producir péptidos de FVIII, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Los péptidos de FVIII de la presente invención pueden producirse mediante expresión en un sistema de huésped procarionota o eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2; células de insecto, por ejemplo células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, por ejemplo células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, los péptidos de FVIII pueden expresarse en células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células aviares, células de mamífero, y similares. En algunas realizaciones, los péptidos pueden expresarse en una línea celular humana, una línea celular de hámster o una línea celular murina. En una realización particular, la línea celular es una línea celular CHO, BHK o HEK.

Puede usarse una amplia variedad de vectores para la expresión de los péptidos de FVIII y pueden seleccionarse de vectores de expresión procarionota y eucariotas. Los vectores incluirán una secuencia de nucleótidos necesaria para la expresión de al menos uno de los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento. Los ejemplos de vectores para expresión procarionota incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD, etc., en los que los promotores usados en vectores de expresión procarionota incluyen lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Los ejemplos de vectores para expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pCDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes, retrovirus, etc., usando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y  $\beta$ -actina.

En algunas realizaciones de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico para producir los péptidos de FVIII incluyen además otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tal como secuencias de promotor, potenciadores, cajas TATA, sitios de iniciación de la transcripción, poliligadores, sitios de restricción, secuencias de poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de selección, y similares que conoce generalmente una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

Los medios de cultivo usados para las células que producen péptidos de FVIII pueden basarse en un medio basal adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, DMEM, F12 de Ham, medio 199, McCoy o RPMI. El medio basal puede incluir varios componentes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas y fuentes de hidratos de carbono. Cada componente puede estar presente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula, siendo tales cantidades generalmente conocidas por un experto en la técnica. El medio puede incluir sustancias auxiliares, tales como sustancias tampón, por ejemplo, bicarbonato de sodio, antioxidantes, estabilizadores para contrarrestar la tensión mecánica o inhibidores de proteasas. Si es necesario, puede añadirse un tensioactivo no iónico tal como copolímeros y/o mezclas de polietilenglicoles y polipropilenglicoles.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo está libre de proteína añadida de manera exógena. "Libre de proteína" y términos relacionados se refiere a una proteína que es de una fuente exógena a o distinta de las células en el cultivo, que secretan de manera natural proteínas durante el crecimiento. En otra realización, el medio de cultivo está libre de polipéptidos. En otra realización, el medio de cultivo está libre de suero. En otra realización el medio de cultivo está libre de proteína animal. En otra realización el medio de cultivo está libre de componentes animales. En otra realización, el medio de cultivo contiene proteína, por ejemplo, proteína animal de suero tal como suero fetal bovino. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes añadidas de manera exógena. En otra realización, las proteínas son de un animal libre de patógenos certificado.

Se conocen en la técnica métodos de preparación de medios de cultivo libres de proteínas animales y químicamente definidos, por ejemplo en los documentos US 2008/0009040 y US 2007/0212770. En una realización, el medio de cultivo usado en los métodos descritos en el presente documento está libre de proteínas animales o es un medio libre de oligopéptidos. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede estar definido químicamente. El término "definido químicamente" tal como se usa en el presente documento significará que el medio no comprende

ningún complemento no definido, tal como, por ejemplo, extractos de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levadura. Por consiguiente, cada componente de un medio químicamente definido está definido con precisión.

5 En determinadas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden incluir el uso de un sistema de cultivo celular que funciona en, por ejemplo, modo discontinuo, modo semicontinuo, modo de alimentación discontinua o modo continuo. Un cultivo discontinuo puede ser un cultivo celular a gran escala en el que se cultiva un inóculo celular hasta una densidad máxima en un tanque o fermentador, y se recoge y procesa como un lote. Un cultivo de alimentación discontinua puede ser un cultivo discontinuo al que se le suministran nutrientes nuevos (por ejemplo, sustratos que limitan el crecimiento) o aditivos (por ejemplo, precursores de productos). Un cultivo continuo puede ser un cultivo en suspensión al que se le suministran de manera continua nutrientes mediante el flujo de entrada de medio nuevo, en el que el volumen de cultivo es habitualmente constante. De manera similar, fermentación continua puede referirse a un proceso en el que células o microorganismos se mantienen en cultivo en la fase de crecimiento exponencial mediante la adición continua de medio nuevo que está exactamente equilibrada por la eliminación de suspensión celular del biorreactor. Además, puede usarse un sistema de reactor de tanque agitado para cultivos en suspensión, perfusión, quimiostáticos y/o de microportador. Generalmente, el sistema de reactor de tanque agitado puede hacerse funcionar como cualquier reactor de tanque agitado convencional con cualquier tipo de agitador tal como un agitador Rushton, de hidroala, de paleta inclinada o marino.

20 En determinadas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la invención pueden incluir el uso de un microportador. En algunas realizaciones, los cultivos celulares de las realizaciones pueden realizarse en biorreactores grandes en condiciones adecuadas para proporcionar áreas de superficie de cultivo específicas de alto volumen para lograr altas densidades de células y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es usar microportadores para cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. El concepto de crecimiento celular sobre microportadores lo describió por primera vez van Wezcl (van Wezcl, A.L., Nature 216:64-5 (1967)) y permite la unión de células sobre la superficie de partículas sólidas pequeñas suspendidas en el medio de crecimiento. Estos métodos proporcionan altas razones de superficie con respecto a volumen y, por tanto, permiten una utilización de nutrientes eficaz. Además, para la expresión de proteínas secretadas en líneas celulares eucariotas, la razón de superficie con respecto a volumen aumentada permite mayores niveles de secreción y, por tanto, mayores rendimientos de proteína en el sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten un aumento a escala fácil de los cultivos de expresión eucariota.

Las células que expresan péptidos de FVIII pueden unirse a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores basados en dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros. También es posible hacer crecer las células para dar una biomasa sobre microportadores esféricos y subcultivar las células cuando han alcanzado la biomasa de fermentador final y antes de la producción de la proteína expresada sobre un microportador poroso o viceversa. Los microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2 y Cytodex™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

Una persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que los péptidos de FVIII producidos mediante los métodos sintéticos y/o recombinantes descritos anteriormente pueden incluir aminoácidos naturales y/o no naturales, incluyendo análogos de aminoácido y/o miméticos de aminoácido.

#### 45 V. Composiciones de péptidos de factor FVIII para inducir tolerancia inmunitaria

La presente invención proporciona composiciones definidas en las reivindicaciones 6 a 8. Los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento pueden incluirse en una composición farmacéutica. En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup>, péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> o péptido de factor VIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento.

En una realización, la composición farmacéutica comprende un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup> tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un péptido de FVIII<sup>474-494</sup>, péptido de FVIII<sup>540-560</sup>, péptido de FVIII<sup>1785-1805</sup>, péptido de FVIII<sup>2025-2045</sup>, péptido de FVIII<sup>2160-2180</sup>, péptido de FVIII<sup>102-119</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup>, péptido de FVIII<sup>102-122</sup> o segundo péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, tal como se describe en el presente documento.

En otra realización, la composición farmacéutica comprende un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un péptido de FVIII<sup>474-494</sup>, péptido de FVIII<sup>540-560</sup>, péptido de FVIII<sup>1785-1805</sup>, péptido de FVIII<sup>2025-2045</sup>, péptido de FVIII<sup>2160-2180</sup>, péptido de FVIII<sup>102-119</sup>, péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>102-122</sup> o segundo péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup>, tal como se describe en el presente documento.

65 En otra realización, la composición farmacéutica comprende un péptido de factor VIII<sup>102-122</sup> tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un péptido de

FVIII<sup>474-494</sup>, péptido de FVIII<sup>540-560</sup>, péptido de FVIII<sup>1785-1805</sup>, péptido de FVIII<sup>2025-2045</sup>, péptido de FVIII<sup>2160-2180</sup>, péptido de FVIII<sup>102-119</sup>, péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> o segundo péptido de FVIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento.

- 5 También se divulga en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un péptido que tiene la secuencia:  $(R^1)_x\text{-P-(R}^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68, 344 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno. En una realización,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos.

15 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

30 En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

40 En una realización específica, la composición farmacéutica comprende además un segundo polipéptido, teniendo el segundo polipéptido la secuencia:  $(R^1)_x\text{-P-(R}^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno. En una realización,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos.

50 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

65 En una realización, el segundo péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el segundo péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el segundo péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el segundo péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el segundo péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

5

#### A. Administración

Para administrar las composiciones a un humano o animal de prueba, en un aspecto, las composiciones pueden incluir uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las frases “farmacéuticamente” o “farmacológicamente” aceptables se refiere a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas o péptidos tal como agregación y productos de escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación. “Portadores farmacéuticamente aceptables” incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción útiles y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, por vía tópica, por vía transdérmica, por vía parenteral, mediante pulverizador de inhalación, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal, o técnicas de infusión. También se contempla la administración mediante inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y o implantación quirúrgica en un sitio particular. Generalmente, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que podrían ser perjudiciales para el receptor.

Las dosificaciones y frecuencia de administración dependerán de diversos factores apreciados generalmente por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la gravedad de la hemofilia de un paciente y/o si la tolerancia inmunitaria se induce más eficazmente usando dosis mayores o menores. Las dosis diarias típicas pueden oscilar entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/kg. Las dosis en el intervalo de 0,07-700 mg de péptido de FVIII a la semana pueden ser eficaces y se toleran bien, aunque incluso dosis semanales superiores pueden ser apropiadas y/o tolerarse bien. El factor determinante principal en la definición de la dosis apropiada es la cantidad de un péptido de FVIII particular necesaria para que sea terapéuticamente eficaz en un contexto particular. Pueden requerirse administraciones repetidas con el fin de lograr una tolerancia inmunitaria duradera más prolongada. Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples de las composiciones seleccionando el médico encargado el patrón y los niveles de dosis.

En un aspecto, las composiciones de la invención pueden administrarse mediante un bolo. Como otro ejemplo, un péptido de FVIII puede administrarse como una sola dosis. Las personas de experiencia ordinaria en la técnica optimizarán fácilmente regímenes de administración y dosificaciones eficaces tal determinados conforme a la buena práctica médica y en función del estado clínico del paciente individual. La frecuencia de dosificación depende de la vía de administración. La composición farmacéutica óptima la determina un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y dosificación deseada. Véase por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Remington the Science and Practice of Pharmacy), 21<sup>a</sup> ed. (2005, Lippincott Williams & Wilkins). Tales composiciones influyen en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, se calcula una dosis adecuada según el peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño del órgano. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas a través del uso de ensayos establecidos para determinar las dosificaciones a nivel sanguíneo conjuntamente con datos de respuesta a la dosis apropiados. El régimen de dosificación final lo determina el médico encargado, considerando diversos factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la respuesta del paciente, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden un péptido de FVIII divulgadas en el presente documento se liofilizan antes de su administración. La liofilización se lleva a cabo usando técnicas comunes en la técnica y deben optimizarse para la composición que está desarrollándose, tal como se describe, por ejemplo, en Tang *et al.*, Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang *et al.*, Pharm Res. 13:243-9 (1996). Los métodos de preparación de composiciones farmacéuticas pueden incluir una o más de las siguientes etapas: añadir un agente estabilizante a la mezcla antes de la liofilización, añadir al menos un agente seleccionado de un agente de carga, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo a la mezcla antes de la liofilización. Una formulación liofilizada está comprendida, en un aspecto, al menos por uno o más de un tampón, un agente de carga y un estabilizador. En este aspecto, la utilidad de un tensioactivo se evalúa y se selecciona en casos en donde la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución se convierte en un problema. Se incluye un agente de tamponamiento apropiado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización.

La práctica de reconstitución convencional para material liofilizado es añadir de nuevo un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (normalmente equivalente al volumen retirado durante la liofilización), aunque

algunas veces se usan disoluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para administración parenteral. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de péptidos de FVIII reconstituidas que comprenden la etapa de añadir un diluyente a composiciones de péptidos de FVIII liofilizadas.

5 En algunas realizaciones, el material liofilizado puede reconstituirse como una disolución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con conservantes para uso de múltiples dosis, o agua con cantidades apropiadas de tensioactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En diversos aspectos, 10 tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo y sin limitación, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes humectantes o de dispersión son un fosfátido que se produce de manera natural, por ejemplo y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquieno con ácidos grasos, por ejemplo y sin limitación, poli(estearato de oxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de 15 cadena larga, por ejemplo y sin limitación, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo y sin limitación, monooleato de polietilensorbitano. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más conservantes, por ejemplo y sin limitación, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo.

#### VI. Métodos de tratamiento

25 La presente invención se refiere además a péptidos para su uso en métodos de tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad asociada con la proteína FVIII, tal como hemofilia A o hemofilia adquirida, tal como se define en las reivindicaciones 9 a 10. Tales métodos pueden incluir la administración de al menos uno de los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento. En particular, las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos uno de los péptidos de FVIII pueden administrarse para inducir tolerancia inmunitaria a la proteína FVIII en un paciente.

30 En algunas realizaciones, los métodos para inducir una tolerancia inmunitaria a FVIII pueden incluir impedir el desarrollo de inhibidor de FVIII tras la administración de FVIII. El término "impedir" se refiere a no permitir una respuesta inmunitaria sustancialmente detectable a FVIII. Por ejemplo, un paciente antes de la administración de la proteína FVIII puede no tener ningún anticuerpo anti-FVIII detectable. Sin embargo, tras la terapia de administración con proteína FVIII, el nivel de anticuerpos anti-FVIII detectables puede aumentar si no se administra un péptido de 35 FVIII para inducir tolerancia inmunitaria. La administración de los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento puede inducir tolerancia inmunitaria, tratando de ese modo a un paciente que tiene hemofilia.

40 En otras realizaciones, los métodos para inducir una tolerancia inmunitaria a la proteína FVIII pueden incluir tratar pacientes que ya tienen inhibidores de FVIII establecidos. En estas realizaciones, la administración del péptido de FVIII puede reducir o eliminar la presencia de anticuerpos anti-FVIII. El término "reducir" significa una reducción parcial en una respuesta inmunitaria a proteína FVIII. En determinadas realizaciones, la reducción de la respuesta inmunitaria puede incluir una reducción del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % en la respuesta inmunitaria en comparación con el nivel de la respuesta inmunitaria en un paciente antes de la administración del péptido de FVIII. Por ejemplo, el porcentaje de reducción puede analizarse midiendo la cantidad 45 de anticuerpos anti-FVIII presentes en la sangre antes y después de la administración del péptido de FVIII, usando métodos convencionales para determinar la cantidad de anticuerpos frente a FVIII presentes. En otras realizaciones, la reducción de la respuesta inmunitaria puede incluir medir niveles reducidos de células T CD4<sup>+</sup> específicas para FVIII o células B específicas para FVIII que secretan anticuerpos frente a FVIII, o una combinación de los tres, las células T, células B y los anticuerpos anti-FVIII. Pueden aislarse células inmunitarias, tales como células T y B 50 específicas para FVIII usando métodos generalmente conocidos en la técnica.

55 En un aspecto, la presente divulgación incluye un método de inducción de tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto, comprendiendo el método una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de FVIII tal como se describe en el presente documento. En una realización específica, el péptido de FVIII es un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup>, péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> o péptido de factor VIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento.

60 En una realización, el método comprende una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de factor VIII<sup>246-266</sup> tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un péptido de FVIII<sup>474-494</sup>, péptido de FVIII<sup>540-560</sup>, péptido de FVIII<sup>1785-1805</sup>, péptido de FVIII<sup>2025-2045</sup>, péptido de FVIII<sup>2160-2180</sup>, péptido de FVIII<sup>102-119</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup>, péptido de FVIII<sup>102-122</sup> o un segundo péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, tal como se describe en el presente documento.

65 En otra realización, el método comprende una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> tal como se describe en el

presente documento. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un péptido de FVIII<sup>474-494</sup>, péptido de FVIII<sup>540-560</sup>, péptido de FVIII<sup>1785-1805</sup>, péptido de FVIII<sup>2025-2045</sup>, péptido de FVIII<sup>2160-2180</sup>, péptido de FVIII<sup>102-119</sup>, péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>102-122</sup> o un segundo péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup>, tal como se describe en el presente documento.

5 En otra realización, el método comprende una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de factor VIII<sup>102-122</sup> tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un péptido de FVIII<sup>474-494</sup>, péptido de FVIII<sup>540-560</sup>, péptido de FVIII<sup>1785-1805</sup>, péptido de FVIII<sup>2025-2045</sup>, péptido de FVIII<sup>2160-2180</sup>, péptido de FVIII<sup>102-119</sup>,  
10 péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> o un segundo péptido de FVIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento.

También se proporciona en el presente documento un método para inducir una tolerancia inmunitaria a una proteína FVIII, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido que tiene la secuencia:  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68, 344 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno; induciendo de ese modo una tolerancia inmunitaria a proteína FVIII en el sujeto. En determinadas realizaciones,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos.

En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.

En una realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.

Los métodos de inducción de tolerancia inmunitaria pueden incluir además terapias de combinación en las que pueden administrarse varios péptidos para inducir tolerancia inmunitaria. En una realización, el método de inducción de tolerancia inmunitaria comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo péptido que tiene la secuencia:  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno; induciendo de ese modo una tolerancia inmunitaria a proteína FVIII en el sujeto. En determinadas realizaciones,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En una realización particular, el segundo péptido consiste en desde 9 hasta 80 aminoácidos. En otra realización particular, cualquier aminoácido adicional en el segundo péptido son aminoácidos naturales. En otra realización particular, el segundo péptido consiste en desde 9 hasta 40 aminoácidos de longitud. En una realización específica, el segundo péptido consiste en desde 9 hasta 80 aminoácidos de longitud y cualquier aminoácido adicional en el segundo péptido son aminoácidos naturales.

En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten

- en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.
- 15 En una realización, el segundo péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 150 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 100 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 50 aminoácidos. En otra realización, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 25 aminoácidos. En aún otras realizaciones más, el péptido de FVIII consiste en desde 9 hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ó 180 aminoácidos.
- 20 En una realización específica de método para inducir una tolerancia inmunitaria, en la que la composición farmacéutica administrada comprende un péptido en el que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 68, 344 ó 740, la composición comprende además un segundo polipéptido, teniendo el segundo polipéptido la secuencia:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740,  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno.
- 25 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 aminoácidos.
- 35 Un péptido de FVIII tal como se describe en el presente documento puede usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una respuesta inmunitaria generada contra la terapia de reemplazo de FVIII. En una realización específica, el péptido de FVIII es un péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup>. En un aspecto relacionado, un péptido de FVIII tal como se describe en el presente documento puede usarse para la fabricación de un medicamento para la prevención de una respuesta inmunitaria generada contra la terapia de reemplazo de FVIII. En una realización específica, el péptido de FVIII es un péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup>.
- 40 En un aspecto, un péptido de FVIII puede usarse como medicamento. En una realización específica, la divulgación proporciona un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> que tiene la secuencia: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344),  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno para su uso como medicamento.
- 45 En un aspecto, un péptido de FVIII puede usarse para el tratamiento de una respuesta inmunitaria generada contra la terapia de reemplazo de FVIII. En una realización específica, la invención proporciona un polipéptido que tiene la

secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> que tiene la secuencia: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno para el tratamiento de una respuesta inmunitaria generada contra la terapia de reemplazo de FVIII.

En un aspecto, un péptido de FVIII puede usarse para la prevención de una respuesta inmunitaria generada contra la terapia de reemplazo de FVIII. En una realización específica, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia  $(R^1)_xP-(R^2)_y$ , en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de un péptido de factor VIII<sup>1401-1424</sup> que tiene la secuencia: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos, en la que cada uno de x e y son independientemente cero o uno para la prevención de una respuesta inmunitaria generada contra la terapia de reemplazo de FVIII.

### VII. Inmunodiagnóstico

También se divulga en el presente documento un método para monitorizar la terapia de reemplazo de FVIII o terapia de inducción de tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto que lo necesita identificando la presencia o el nivel de un anticuerpo inhibidor de FVIII o célula T CD4<sup>+</sup> que es específica para FVIII en una muestra biológica tomada del sujeto.

En una realización, el método comprende un método para monitorizar la terapia de reemplazo de FVIII en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> o péptido de FVIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento; y detectar un complejo formado entre el péptido de FVIII y un anticuerpo inhibidor de FVIII presente en la muestra. En una realización, el método comprende determinar el nivel de anticuerpo inhibidor de FVIII en la muestra. En aún otra realización más, el método comprende determinar el nivel de un anticuerpo inhibidor de FVIII en al menos dos muestras tomadas del sujeto a diferentes tiempos, y comparar los niveles de anticuerpo inhibidor de FVIII entre las dos muestras, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo a lo largo del tiempo es indicativo de la formación de una respuesta inmunitaria frente a FVIII administrado al sujeto durante el transcurso de la terapia de reemplazo de FVIII.

En otra realización, el método comprende un método para monitorizar la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> o péptido de FVIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento; y detectar un complejo formado entre el péptido de FVIII y un anticuerpo inhibidor de FVIII presente en la muestra. En una realización, el método comprende determinar el nivel de anticuerpo inhibidor de FVIII en la muestra. En aún otra realización más, el método comprende determinar el nivel de un anticuerpo inhibidor de FVIII en al menos dos muestras tomadas del sujeto a diferentes tiempos, y comparar los niveles de anticuerpo inhibidor de FVIII entre las dos muestras, en el que una disminución en el nivel de anticuerpo a lo largo del tiempo es indicativa de la formación de tolerancia inmunitaria a proteína FVIII en el sujeto.

En una realización, el método comprende un método para monitorizar la terapia de reemplazo de FVIII en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> o péptido de FVIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento; y detectar un complejo formado entre el péptido de FVIII y una célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII presente en la muestra. En una realización, el método comprende determinar el nivel de célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII en la muestra. En aún otra realización más, el método comprende determinar el nivel de una célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII en al menos dos muestras tomadas del sujeto a diferentes tiempos, y comparar los niveles de célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII entre las dos muestras, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo a lo largo del tiempo es indicativo de la formación de una respuesta inmunitaria frente a FVIII administrado al sujeto durante el transcurso de la terapia de reemplazo de FVIII. En una realización específica, el péptido de FVIII se compleja con un multímero de CMH de clase II.

En otra realización, el método comprende un método para monitorizar la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un péptido de FVIII<sup>246-266</sup>, péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> o péptido de FVIII<sup>102-122</sup>, tal como se describe en el presente documento; y detectar un complejo formado entre el péptido de FVIII y una célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII presente en la muestra. En una realización, el método comprende determinar el nivel de célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII en la muestra. En aún otra realización más, el método comprende determinar el nivel de una célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII en al menos dos muestras tomadas del sujeto a diferentes tiempos, y comparar los niveles de célula T CD4<sup>+</sup> específica para FVIII entre las dos muestras, en el que una disminución en el nivel de anticuerpo a lo largo del tiempo es indicativa de la formación de tolerancia inmunitaria a proteína FVIII en el sujeto. En una realización específica, el péptido de FVIII se compleja con un multímero de CMH de clase II.

Tal como apreciará una persona de experiencia ordinaria en la técnica, puede usarse monitorización inmunitaria, por ejemplo, para facilitar el tratamiento de pacientes con hemofilia. Por ejemplo, puede usarse monitorización inmunitaria para identificar si la administración de los péptidos y/o composiciones de la presente invención está impidiendo o reduciendo una respuesta inmunitaria a un producto de FVIII. Pueden optimizarse las cantidades de dosificación y/o intervalos de dosificación mediante monitorización inmunitaria. En algunas realizaciones, las dosificaciones de administración pueden adaptarse específicamente basándose en los resultados de la monitorización inmunitaria de la prevención o reducción de anticuerpos anti-FVIII. Además, los intervalos de dosificación así como las cantidades de dosificación pueden determinarse para un paciente o grupo de pacientes particulares.

#### A. Métodos de identificación de células T específicas de FVIII

En otro aspecto, la presente invención incluye métodos de identificación de células T específicas de antígeno, más específicamente células T que son específicas para proteína FVIII y los péptidos de FVIII descritos en el presente documento, tal como se define en las reivindicaciones 11 a 15. Tales métodos pueden usarse, por ejemplo, para inmunodiagnóstico, tal como monitorización inmunitaria de un paciente. La presente divulgación también incluye un método para identificar células T específicas de péptido de FVIII, comprendiendo el método a) combinar una pluralidad de células T CD4<sup>+</sup> con un péptido de FVIII complejado con un multímero de CMH de clase II, teniendo el péptido de FVIII la secuencia: (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>, en la que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a una secuencia de al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68, 344 y 740, R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno; y b) identificar al menos uno de los miembros de la pluralidad de células T CD4<sup>+</sup> que es específica para el péptido complejado con el multímero de CMH de clase II. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos, y R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 40 aminoácidos.

En determinadas realizaciones, los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento pueden usarse para generar reactivos adecuados para tinción directa de células T específicas de FVIII. Por ejemplo, los multímeros de CMH de clase II que presentan los péptidos de FVIII de la presente invención pueden incluir una variedad de formas, tales como un tetrámero de CMH de clase II. Estas moléculas de CMH de clase II pueden modificarse adicionalmente para incluir un agente de diagnóstico. Alternativamente, los péptidos de FVIII que se complejan con los multímeros de CMH de clase II pueden incluir un agente de diagnóstico. Los agentes de diagnóstico (es decir, un resto detectable) usados en la presente invención pueden incluir los conocidos generalmente en la técnica para monitorización inmunitaria. Por ejemplo, pueden identificarse y/o aislarse células T específicas de FVIII basándose en la detección de un agente de diagnóstico asociado con un péptido de FVIII descrito en el presente documento presentado por un tetrámero de CMH de clase II. Los agentes de diagnósticos adecuados pueden incluir un agente fluorescente, un agente quimioluminiscente, un agente radiactivo, un agente de contraste, y similares. Los agentes de fluorescencia adecuados incluyen los normalmente usados en citometría de flujo y pueden incluir pero no se limitan a isotiocianato de fluoresceína, R-ficoeritrina, rojo Texas, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, y derivados de los mismos.

En determinadas realizaciones, el péptido de FVIII puede usarse para reestimar células T específicas de FVIII CD4<sup>+</sup> *in vitro*. En estas realizaciones, la reestimulación de las células T podría monitorizarse mediante la detección de proliferación, secreción de citocinas o quimiocinas, o la regulación por incremento o disminución de determinados marcadores de activación que conocen los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la detección del agente de diagnóstico puede usarse para identificar y/o aislar células T específicas para los péptidos de FVIII divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los reactivos anteriores (por ejemplo, péptido, tetrámero de CMH de clase II y agente de diagnóstico) pueden usarse para rastrear células T específicas de FVIII *in vitro* o *ex vivo*. En determinadas realizaciones, las células T pueden aislarse y caracterizarse adicionalmente usando diversas técnicas conocidas generalmente en la técnica, tales como citometría de flujo, por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), y/o PCR, por ejemplo, PCR unicelular.

Para llevar a cabo análisis de monitorización inmunitaria, las células T que se unen al complejo de péptido de FVIII-multímero de CMH de clase II incluyen células T CD4<sup>+</sup> y pueden aislarse de un paciente usando una variedad de métodos conocidos generalmente en la técnica. Por ejemplo, pueden aislarse y purificarse células T procedentes de la sangre, los órganos u otro tejido de un paciente. El aislamiento y la identificación de las células T específicas de FVIII pueden usarse para una variedad de aplicaciones de inmunodiagnóstico. En determinadas realizaciones, los péptidos de FVIII o reactivos asociados pueden usarse para la monitorización inmunitaria de células T específicas de FVIII durante el desarrollo clínico de un nuevo producto de FVIII. En otras realizaciones, los péptidos de FVIII pueden usarse para la monitorización inmunitaria de células T específicas de FVIII durante la terapia de inducción de tolerancia inmunitaria. En aún otras realizaciones más, los péptidos de FVIII pueden usarse para la monitorización inmunitaria de células T específicas de FVIII durante el tratamiento con FVIII.

#### VIII. Kits

También se proporcionan en el presente documento kits para facilitar y/o estandarizar el uso de composiciones proporcionadas por la presente invención, así como para facilitar los métodos de la presente invención. Los materiales y reactivos para llevar a cabo estos diversos métodos pueden proporcionarse en kits para facilitar la ejecución de los métodos. Tal como se usa en el presente documento, el término "kit" se usa en referencia a una combinación de artículos que facilitan un procedimiento, ensayo, análisis o manipulación.

Los kits pueden contener reactivos químicos (por ejemplo, péptidos de FVIII o polinucleótidos que codifican péptidos de FVIII) así como otros componentes. Además, los kits según la presente invención pueden incluir también, por ejemplo pero no se limitan a, un aparato y reactivos para la recogida y/o purificación de muestras, un aparato y reactivos para la recogida y/o purificación de productos, reactivos para transformación de células bacterianas, reactivos para transfección de células eucariotas, células huésped previamente transformadas o transfectadas, tubos, soportes, bandejas, rejillas, platos, placas de muestras, instrucciones para el usuario del kit, disoluciones, tampones u otros reactivos químicos, muestras adecuadas para usarse para la estandarización, normalización y/o muestras de control. Los kits según la presente invención también pueden envasarse para su almacenamiento conveniente y envío seguro, por ejemplo, en una caja que tiene una tapa.

En algunas realizaciones, por ejemplo, los kits según la presente invención pueden proporcionar un péptido de FVIII de la invención, un vector de polinucleótido (por ejemplo, un plásmido) que codifica un péptido de FVIII de la invención, cepas de células bacterianas para la propagación del vector, y reactivos para la purificación de proteínas de fusión expresadas. Alternativamente, un kit puede proporcionar los reactivos necesarios para realizar la mutagénesis de un péptido de FVIII con el fin de generar una variante modificada de manera conservativa del péptido de FVIII.

Un kit puede contener una o más composiciones de la invención, por ejemplo, una o una pluralidad de péptidos de FVIII o uno o una pluralidad de polinucleótidos que codifican los péptidos de FVIII. Alternativamente, un kit puede contener reactivos (por ejemplo, péptido, tetrámero de CMH de clase II y agente de diagnóstico) para llevar a cabo la monitorización inmunitaria de un paciente.

Un kit según la invención también puede contener una o una pluralidad de moléculas de ácido nucleico recombinante, que codifican los péptidos de FVIII, que pueden ser iguales o diferentes, y pueden incluir además, por ejemplo, un segundo polinucleótido operativamente unido que contiene o que codifica un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción o un sitio de reconocimiento de recombinasas, o cualquier polipéptido de interés. Además, el kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes del kit, particularmente las composiciones de la invención que están contenidas en el kit.

#### IX. Realizaciones específicas

También se proporciona en el presente documento un péptido de FVIII que consiste en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la siguiente secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), y el péptido tiene la fórmula:  $(R^1)_x$ -péptido- $(R^2)_y$ , en la que  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno.

En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 80 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 70 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 60 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 50 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 40 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 30 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 20 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 10 aminoácidos. En otra realización,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 5 aminoácidos. En aún otra realización más,  $R^1$  y  $R^2$  son por separado o ambas secuencias de aminoácidos que consisten en desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 aminoácidos.

En una realización específica de los péptidos descritos anteriormente, x e y son ambos cero.

En una realización específica de los péptidos descritos anteriormente, x es uno e y es cero.

En una realización específica de los péptidos descritos anteriormente, x es cero e y es uno.

En una realización específica de los péptidos descritos anteriormente, x e y son ambos uno.

5 En una realización específica de los péptidos descritos anteriormente, la secuencia consecutiva de nueve aminoácidos es idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344).

10 También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un péptido de FVIII que consiste en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la siguiente secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), y el péptido tiene la fórmula:  $(R^1)_x$ -péptido- $(R^2)_y$ , en la que  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno.

15 En una realización específica de las composiciones descritas anteriormente, x e y son ambos cero.

En una realización específica de las composiciones descritas anteriormente, x es uno e y es cero.

20 En una realización específica de las composiciones descritas anteriormente, x es cero e y es uno.

En una realización específica de las composiciones descritas anteriormente, x e y son ambos uno.

25 En una realización específica de las composiciones descritas anteriormente, la composición comprende además al menos un péptido que consiste en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en una secuencia de aminoácidos independientemente seleccionada del grupo que consiste en GEVGDTHLLIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159), PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO: 250), EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477), LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568), NPPIIARYIRLHPTHYSIRST (SEQ ID NO: 659), TVVITLKNMASHPVSLHA (SEQ ID NO: 10), AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68) y TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), en las que el al menos un péptido tiene un máximo de 80 aminoácidos de longitud y en las que cualquier aminoácido adicional en el al menos un péptido son aminoácidos naturales.

35 También se proporciona en el presente documento un método para inducir una tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto, comprendiendo el método una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de FVIII que consiste en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la siguiente secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), y el péptido tiene la fórmula:  $(R^1)_x$ -péptido- $(R^2)_y$ , en la que  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno; e induciendo de ese modo una tolerancia inmunitaria a proteína FVIII en el sujeto.

45 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la composición farmacéutica comprende además al menos un péptido que consiste en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en una secuencia de aminoácidos independientemente seleccionada del grupo que consiste en GEVGDTHLLIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159), PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO: 250), EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477), LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568), NPPIIARYIRLHPTHYSIRST (SEQ ID NO: 659), TVVITLKNMASHPVSLHA (SEQ ID NO: 10), AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68) y TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), en las que el al menos un péptido tiene un máximo de 80 aminoácidos de longitud y en las que cualquier aminoácido adicional en el al menos un péptido son aminoácidos naturales.

50 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la administración de la composición farmacéutica previene el desarrollo de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto.

55 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la administración de la composición farmacéutica reduce una cantidad anticuerpos anti-FVIII presentes en el sujeto.

60 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos cero.

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es uno e y es cero.

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es cero e y es uno.

65 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos uno.

- La presente invención proporciona un método según la reivindicación 20. También se proporciona en el presente documento un método de preparación de un péptido de FVIII, comprendiendo el método las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un vector que codifica un péptido de FVIII que consiste en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la siguiente secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), y el péptido tiene la fórmula:  $(R^1)_x$ -péptido- $(R^2)_y$  en la que  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno; y b) expresar el péptido en el cultivo de células.
- 5 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos cero.
- 10 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es uno e y es cero.
- 15 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es cero e y es uno.
- 20 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos uno.
- También se proporciona en el presente documento un método de preparación de un péptido de FVIII, comprendiendo el método: a) sintetizar un péptido usando técnicas de síntesis en fase sólida o fase líquida, consistiendo el péptido en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la siguiente secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), y el péptido tiene la fórmula:  $(R^1)_x$ -péptido- $(R^2)_y$  en la que  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno.
- 25 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos cero.
- 30 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es uno e y es cero.
- 35 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es cero e y es uno.
- 40 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos uno.
- La presente invención proporciona un método según las reivindicaciones 11 a 15. También se proporciona en el presente documento un método de identificación de células T específicas de péptido de FVIII, comprendiendo el método: a) combinar una pluralidad de células T  $CD4^+$  con un péptido de FVIII complejo con un multímero de CMH de clase II, consistiendo el péptido de FVIII en una secuencia consecutiva de nueve aminoácidos que es al menos el 85 % idéntica a nueve aminoácidos consecutivos en la siguiente secuencia de aminoácidos: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), y el péptido tiene la fórmula:  $(R^1)_x$ -péptido- $(R^2)_y$ , en la que  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; cada uno de los subíndices x e y son independientemente cero o uno; y b) identificar al menos uno de los miembros de la pluralidad de células T  $CD4^+$  que es específica para el péptido complejo con el multímero de CMH de clase II.
- 45 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el multímero de CMH de clase II es un tetrámero de CMH de clase II.
- 50 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el péptido o multímero de CMH de clase II comprende además un agente de diagnóstico.
- 55 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el agente de diagnóstico identifica el al menos un miembro de la pluralidad de células T  $CD4^+$  que es específica para el péptido.
- 60 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el método comprende además aislar el al menos un miembro de la pluralidad de células T  $CD4^+$  que es específica para el péptido basándose en la detección del agente de diagnóstico.
- 65 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el al menos un miembro de la pluralidad de células T  $CD4^+$  se aísla con citometría de flujo.
- En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos cero.
- En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es uno e y es cero.
- En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x es cero e y es uno.

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, x e y son ambos uno.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin limitarse a los mismos.

## 5 X. Ejemplos

### Ejemplo 1

10 Para imitar mejor la molécula de CMH de clase II humana para identificar péptidos de FVIII, se desarrolló un modelo de ratón para hemofilia A con una molécula de CMH de clase II quimérica que portaba un sitio de unión específico de HLA-DRB1\*1501 humano. Este ratón se sometió a retrocruzamiento con un ratón que portaba una desactivación completa de todos los genes de CMH de clase II murinos (Reipert *et al.*, J. Thromb. Haemost. 7 Suppl. 1:92-97 (2009)). En este nuevo modelo de ratón transgénico, todas las respuestas de células T CD4<sup>+</sup> están dirigidas por la molécula de CMH de clase II humana. Se usó este modelo de ratón para identificar péptidos de FVIII presentados por HLA-DRB1\*1501 que dirigen respuestas inmunitarias anti-FVIII en estos ratones.

### Materiales y métodos

20 FVIII: Se produjo FVIII humano recombinante (rFVIII) como producto a granel sin albúmina (Baxter Neuchatel) y producto de FVIII clínico formulado con sacarosa (Advate, Baxter, Westlake Village, CA).

Ratones HLA-DRB15 E17 hemofílicos: Ratones HLA-DRB1\*1501<sup>+/-</sup> E17<sup>-/-</sup> tal como se describe en Reipert *et al.*, J. Thromb. Haemost. 7 Supl. 1:92-97 (2009). Los ratones eran todos machos y con edades de 8 a 12 semanas al comienzo del experimento.

25 Inmunización con FVIII recombinante humano: Los ratones HLA-DRB1\*1501<sup>+/-</sup> E17<sup>-/-</sup> recibieron entre 4 y 8 dosis intravenosas o subcutáneas de 0,2 µg o 1 µg de rFVIII humano a intervalos semanales. Se diluyó rFVIII en el tampón de formulación original o solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contenía calcio y magnesio (DPBS; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

30 Preparación de células: Se obtuvieron bazos de 3 a 7 días tras la última inmunización con rFVIII. Se trituraron células de bazo y se hicieron pasar a través de un tamiz de células de 70 µm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se recogieron células individuales en medio de cultivo: medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con suero fetal bovino preseleccionado al 10 % (FCS; Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomina 100 U/ml (ambos de Gibco) y mercaptoetanol 5x10<sup>-5</sup> M (Sigma-Aldrich). Se lisaron los eritrocitos usando tampón hipotónico (pH 7,2) compuesto por cloruro de amonio 0,15 M, bicarbonato de potasio 10 mM (ambos de Merck, Darmstadt, Alemania) y ácido etilen-diaminatetraacético 0,1 mM (Sigma-Aldrich). Se lavaron las células y se contaron usando un contador Coulter Z1.

40 Generación de hibridomas de células T para identificar péptidos de FVIII

Reestimulación *in vitro* de células de bazo con rFVIII humano: Se reestimularon células de bazo en presencia de 20 µg/ml de FVIII humano en medio de cultivo a una concentración de 1,5x10<sup>6</sup> células/ml durante 3 ó 10 días. El medio de cultivo para los cultivos de 10 días se renovó tras 6 días.

45 Fusión de células T de ratón con células BW: Los cultivos de células de bazo reestimuladas *in vitro* y las células BW (α-β) se lavaron dos veces con medio de cultivo sin suero y luego se combinaron a una razón de 1:3 a 1:10 (células T:células BW). La línea de células BW se derivó de un linfoma de células T AKR/J de ratón. Estas células no tenían receptores de células T en su superficie (α-β-) y, por tanto, cualquier receptor de células T tras la fusión con células de bazo de ratón se deriva de la pareja de fusión. Tras una tercera etapa de lavado, se retiró el sobrenadante. Se lograron las condiciones de fusión mediante la adición de 1 ml de polietilenglicol (PEG; HybiMax al 50 %, Sigma-Aldrich) en el plazo de 45 segundos. Tras otros 45 segundos de incubación, se añadieron posteriormente 50 ml de medio sin suero para prevenir el efecto tóxico de PEG. Se centrifugaron las células a 1300 rpm durante 5 minutos sin rotura para formar un sedimento muy firme. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 50 ml de medio sin suero nuevo muy lentamente con el objetivo de no alterar el sedimento. Se invirtió el tubo lentamente hasta que las células se resuspendieron y centrifugaron como anteriormente. Esto se realizó dos veces para eliminar el PEG restante. La última etapa de lavado se realizó con medio de cultivo. Entonces se diluyeron las células y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Se cambió el medio de cultivo por medio de selección (complemento de medio HAT, Sigma Aldrich) tras 48 horas y se seleccionaron clones en crecimiento. Se mantuvo el medio de selección durante 2 semanas, después de eso se cambió de nuevo el medio posteriormente a medio de cultivo normal.

50 Especificidad de péptido de hibridomas de células T específicos de FVIII: Se sometieron a prueba hibridomas de células T para determinar su especificidad de antígeno. Para este fin, se cocultivaron 1x10<sup>5</sup> células con células presentadoras de antígenos. Se usaron o bien 5x10<sup>4</sup> células Mgar (que expresan HLA-DRB1\*1501) o bien 1x10<sup>5</sup> células de bazo completas derivadas de ratones HLA-DRB1\*1501 - E17 sin tratamiento previo. Se incubaron las

65

células con 10 µg/ml de rFVIII humano o con 1 µg/ml de conjuntos péptido/péptido durante 24 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la liberación de IL-2 al sobrenadante de cultivo usando un ELISA de IL-2 (BioLegend, San Diego, CA) o Bio-Plex de IL-2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) según el protocolo de los fabricantes. Una liberación de IL-2 ≥ 20 pg/ml en presencia pero no en ausencia de FVIII (o péptidos) se consideró positiva, o alternativamente un aumento de 10 veces en la liberación de IL-2 en presencia de FVIII en comparación con la ausencia de FVIII se consideró positiva.

Subclonación de hibridomas de células T: Para garantizar que cada clon representa sólo un tipo de hibridoma de células T, se subclonaron todos los clones. Se diluyeron clones de hibridoma a una dilución limitante de 0,3 células/pocillo y se cocultivaron con 200 células alimentadoras/pocillo. Se produjeron células alimentadoras mediante tratamiento con mitomicina C de las células de pareja de fusión, células BW. Se trataron 2x10<sup>8</sup> células BW con 0,1 mg de mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (Sigma Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente y 25 minutos a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en el incubador. Se seleccionaron cinco subclones en crecimiento por clon y se sometieron a prueba para determinar su especificidad de FVIII.

Conjuntos de péptidos de FVIII usados para especificar las especificidades de hibridomas de células T: Se produjeron conjuntos de péptidos de FVIII usando el método de síntesis SPOT tal como se describe por Ay *et al.* (Biopolimers 88:64-75 (2007)). En resumen, se sintetizaron péptidos de 15 meros sobre dos membranas de celulosa idénticas. Se cortaron las membranas en tiras verticales y horizontales. Se liberaron los péptidos de las tiras de membrana y se usaron como conjuntos de péptidos en pruebas de especificidad tal como se describió anteriormente. Se disolvieron los péptidos en DMSO (Hybrimax, Sigma Aldrich) y se diluyeron adicionalmente con PBS.

Resultados

Se produjeron 181 clones de hibridoma específicos de FVIII. Se cribaron estos clones frente a una biblioteca de péptidos que abarcaba el FVIII humano completo. Se usaron péptidos de 15 meros con una desviación de tres aminoácidos. Usando este enfoque, se identificaron seis regiones de FVIII diferentes que contenían péptidos unidos a HLA-DRB1\*1501. Se encontraron dos dominios peptídicos dentro del dominio A1, dos péptidos dentro del dominio A2, uno dentro del dominio B, dos dentro del dominio A3 y un dominio peptídico dentro del dominio C1 de FVIII humano. El péptido de FVIII<sup>1401-1424</sup> no se había descrito anteriormente (tabla 11). Los péptidos FVIII<sup>474-494</sup>, FVIII<sup>545-559</sup>, FVIII<sup>1788-1802</sup> y FVIII<sup>2161-2175</sup> se identificaron ya en el documento WO 09/071886, que usó programas de predicción por ordenador seguido por tecnología de hibridomas de células T. El péptido FVIII<sup>2030-2044</sup> se divulgó en el documento WO 03/087161. El péptido FVIII<sup>2161-2180</sup> ya se publicó por Jacquemin *et al.*, Blood 101(4):1351-8 (2003).

Tabla 11. Regiones de FVIII que incluyen epítomos de células T

Regiones que incluyen epítomos de células T	Secuencia de aminoácidos	Divulgaciones
FVIII <sup>102-122</sup>	TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740)	FVIII <sup>107-121</sup> divulgado en el documento WO 2003/087161 FVIII <sup>100-118</sup> divulgado en el documento WO/2009/095646
FVIII <sup>246-266</sup>	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68)	FVIII <sup>253-268</sup> divulgado en el documento WO/2009/095646
FVIII <sup>474-494</sup>	GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159)	FVIII <sup>475-495</sup> divulgado en el documento WO 2009/071886 FVIII <sup>477-495</sup> divulgado en el documento WO/2009/095646
FVIII <sup>540-560</sup>	PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO: 250)	FVIII <sup>542-562</sup> divulgado en el documento WO 2009/071886 FVIII <sup>545-569</sup> divulgado en el documento WO/2009/095646
FVIII <sup>1401-1424</sup>	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344)	Un péptido de la presente invención
FVIII <sup>1785-1805</sup>	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477)	FVIII <sup>1785-1805</sup> divulgado en el documento WO 2009/071886 FVIII <sup>1787-1805</sup> divulgado en el documento WO/2009/095646
FVIII <sup>2025-2045</sup>	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568)	FVIII <sup>2030-2044</sup> divulgado en el documento WO 2003/087161
FVIII <sup>2160-2180</sup>	NPPIIARYIRLHPTHYSIRST (SEQ ID NO: 659)	FVIII <sup>2158-2178</sup> divulgado en el documento WO 2009/071886 y FVIII <sup>2161-2180</sup> Jacquemin <i>et al.</i> , citado anteriormente. FVIII <sup>2164-2183</sup> divulgado en el documento WO

		2003/087161 FVIII <sup>2164-2188</sup> divulgado en el documento WO/2009/095646
--	--	---

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son sólo para fines ilustrativos y que a los expertos en la técnica se les ocurrirán diversas modificaciones o cambios en vista de los mismos.

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos:



en la que:

10 P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 344;

$R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;

15  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno.

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 344.

20 3. Péptido según la reivindicación 1, en el que P es una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 344.

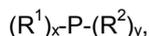
4. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que x e y son ambos cero, o en el que x es uno e y es cero, o en el que x es cero e y es uno, o en el que x e y son ambos uno.

25 5. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el péptido consiste en desde 24 hasta 100 aminoácidos, o en el que el péptido consiste en desde 24 hasta 50 aminoácidos, o en el que el péptido consiste en desde 24 hasta 25 aminoácidos.

30 6. Composición que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Composición según la reivindicación 6, en la que la composición se formula para administración farmacéutica.

35 8. Composición según la reivindicación 6 ó 7, en la que la composición comprende además un segundo polipéptido, consistiendo el segundo polipéptido en la secuencia de aminoácidos:



40 en la que:

P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740;

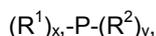
45  $R^1$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;

50  $R^2$  es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y cada uno de x e y es independientemente cero o uno.

9. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en un método para inducir una tolerancia inmunitaria a FVIII en un sujeto que lo necesita.

55 10. Péptido para su uso según la reivindicación 9, en el que el uso comprende además:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en:



60 en la que:

P es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad con respecto a al menos nueve aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 y 740;

65

R<sup>1</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos;

R<sup>2</sup> es una secuencia de aminoácidos que consiste en desde 1 hasta 80 aminoácidos; y

5 cada uno de x e y es independientemente cero o uno.

11. Método para identificar una célula T específica de péptido de FVIII, comprendiendo el método:

10 a) combinar una pluralidad de células T CD4<sup>+</sup> aisladas o hibridomas con un péptido complejo con un multímero de CMH de clase II, en el que el péptido es un péptido de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

15 b) identificar al menos uno de los miembros de la pluralidad de células T CD4<sup>+</sup> que es específica para el péptido complejo con el multímero de CMH de clase II.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el multímero de CMH de clase II es un tetrámero de CMH de clase II.

20 13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que el péptido o multímero de CMH de clase II comprende además un resto detectable.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende además aislar la al menos una célula T CD4<sup>+</sup> que es específica para el péptido.

25 15. Método según la reivindicación 14, en el que la célula T CD4<sup>+</sup> se aísla usando citometría de flujo.

16. Proteína de fusión que comprende:

30 un péptido de factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y un segundo péptido.

17. Proteína de fusión según la reivindicación 16, en la que el segundo péptido es un péptido indicador.

35 18. Proteína de fusión según las reivindicaciones 16 ó 17, en la que la proteína de fusión está codificada por un ácido nucleico.

19. Proteína de fusión según la reivindicación 16 ó 17, en la que el péptido de FVIII está unido químicamente al segundo péptido.

40 20. Método de preparación de un péptido de FVIII, comprendiendo el método las etapas de:

a) proporcionar un cultivo de células que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

45 b) expresar el péptido en el cultivo de células.