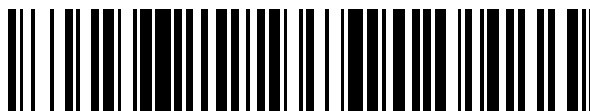


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 361**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/755** (2006.01)

**A61K 38/37** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2013** **PCT/EP2013/060397**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013** **WO13174805**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2013** **E 13724802 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 2852609**

54 Título: **Factor VIII de la coagulación con inmunogenicidad reducida**

30 Prioridad:

**22.05.2012 EP 12168800**

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

**31.03.2020**

73 Titular/es:

**IMNATE SARL (100.0%)**

**19-21 Route d'Arlon**

**8009 Strassen, LU**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**

**INVENCIONES, SLP**

ES 2 751 361 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

Factor VIII de la coagulación con inmunogenicidad reducida

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de factor VIII de la coagulación con inmunogenicidad reducida o inexistente y a su uso en la terapia de trastornos de la coagulación y, en particular, en el tratamiento de la hemofilia de tipo A.

## 10 Antecedentes de la invención

El factor VIII es un factor de la coagulación que actúa como cofactor en la generación de trombina, un componente esencial de la coagulación. En ausencia o insuficiencia de factor VIII funcional, las personas padecen trastornos hemorrágicos, colectivamente llamados hemofilia A. Existen dos tipos de hemofilia A, dependiendo de su origen, genética (hemofilia espontánea) o adquirida (hemofilia adquirida o autoinmunitaria). La hemofilia A espontánea es una enfermedad que afecta a los hombres debido a la localización del gen del factor VIII en el cromosoma X. Las mujeres son portadoras pero no sufren trastornos hemorrágicos debido a la presencia de 2 cromosomas X. La hemofilia espontánea se divide a su vez en 3 subconjuntos de pacientes, definidos según el nivel de factor VIII circulante: hemofilia grave (menos del 1 % de factor VIII), hemofilia leve (del 1 al 5 % de factor VIII) y moderada (concentraciones de factor VIII entre 5 y 10 %).

Los pacientes que sufren hemofilia requieren una terapia de sustitución del factor VIII. Esta es una terapia continuada para pacientes con hemofilia A grave debido al mayor riesgo de hemorragia espontánea, a veces potencialmente mortal, o intermitente en pacientes con hemofilia leve o moderada en los cuales se requiere factor VIII cuando existe un traumatismo o se someten a cirugía y una demanda aguda de mayores concentraciones de factor VIII.

Con mucho, la principal complicación a la que se enfrentan los pacientes con hemofilia A es la aparición de anticuerpos contra el agente terapéutico (factor VIII) utilizado para restablecer una coagulación funcional. Actualmente hay 2 tipos de factor VIII utilizados para la terapia de reemplazo, derivados del plasma y recombinantes. El factor VIII derivado del plasma se produce a partir de conjuntos de plasma humano y contiene proteínas adicionales y, en particular, el compañero fisiológico del factor VIII, el factor von Willebrand. El factor VIII recombinante es producido por ingeniería genética y la producción es mediante células de origen animal o humano. El factor VIII recombinante es puro y no contiene factor von Willebrand. Existe una gran controversia para decidir si existe una diferencia significativa en el riesgo de provocar una respuesta inmunitaria anti-factor VIII cuando se usa una molécula de factor VIII derivada del plasma o recombinante. Cualquiera que sea la situación, como término medio, el 25 % de los pacientes que reciben factor VIII como agente terapéutico generan anticuerpos que inhiben la actividad del agente de reemplazo. Dichos anticuerpos se denominan inhibidores del factor VIII.

No existe cura para los inhibidores del factor VIII. Por razones empíricas, se ha demostrado que la administración diaria de dosis muy altas de factor VIII puede dar como resultado en algunos casos la desaparición de los inhibidores. Esta terapia, inducción de tolerancia inmunitaria, no es muy fiable en cuanto a su éxito. La falta de marcadores indirectos capaces de predecir el resultado de la tolerancia inmunitaria limita de hecho su uso en un intento de eliminar la formación de inhibidores del factor VIII. Además, el costo prohibitivo relacionado con la inducción de tolerancia es tal que solo unos pocos pacientes pueden ser considerados para la inducción de tolerancia.

Los inhibidores del factor VIII son anticuerpos específicos de alta afinidad, lo que implica la participación de los linfocitos T en su formación. La consecuencia de esto es que la respuesta inmunitaria se memoriza por completo, dejando poblaciones de linfocitos B de memoria, que tras la estimulación, se transforman en plasmocitos que producen anticuerpos y linfocitos T de memoria que mantienen la capacidad de aumentar la respuesta de anticuerpos en cada exposición posterior al factor VIII. Los pacientes que presentan inhibidores del factor VIII no pueden tratarse con el factor VIII no solo porque los inhibidores neutralizan la función del factor VIII y, probablemente, aumentan la tasa de eliminación del factor VIII, sino también porque con cada exposición adicional al factor VIII aumentan las concentraciones de dichos inhibidores. Swaroop M et al. (1997) "Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII" Journal of biological chemistry, 272, 24121-24124; Ramezani et al. (2009) "Correction of murine hemophilia A following nonmyeloablative transplantation of hematopoietic stem cells engineered to encode an enhanced human factor VIII variant using a safety-augmented retroviral vector" Blood, 114, 526-534; Los documentos US 2010/233119; US 2009/118184; WO 2006/103298 y EP 1 495 052 B1 describen mutaciones en el Factor VIII.

La solicitud de patente WO 2009/101206 describe un método por el cual es posible eliminar la producción de inhibidores actuando a nivel de la inmunidad adaptativa, es decir, al nivel de la interacción entre los linfocitos T y B específicos del factor VIII. Esta solicitud describe cómo se puede eliminar el riesgo de producir nuevos inhibidores tras la exposición al factor, pero también cómo se pueden erradicar los inhibidores existentes. Sin embargo, hemos descubierto inesperadamente que el factor VIII es un activador muy potente de la inmunidad innata, lo que parece ser un requisito previo para provocar una respuesta adaptativa e inhibidores. Dado que el factor VIII debe administrarse

regularmente (por ejemplo, 2 o 3 veces por semana en pacientes con hemofilia A grave) y que, por lo tanto, persiste el riesgo de provocar una nueva producción de inhibidores del factor VIII, existe una necesidad urgente de definir métodos por los cuales se pueden producir moléculas terapéuticas del factor VIII, que han perdido su capacidad de activar la inmunidad innata.

La solicitud PCT PCT/EP2011/070911 describe métodos mediante los cuales las proteínas con capacidad para activar linfocitos NKT pueden transformarse para perder dicha capacidad. Así pues, Los linfocitos NKT forman parte del sistema inmunitario innato, que convencionalmente se define como carente de memorización. Sin embargo, como se describe en la solicitud PCT PCT/EP2011/070911 los linfocitos NKT pueden reconocer y activarse mediante la presentación de péptidos hidrófobos por la molécula CD1d. Como el péptido se deriva de un antígeno para el cual son específicos los linfocitos NKT, esto representa una activación del sistema inmunitario innato específico de antígeno. La solicitud PCT mencionada anteriormente describe métodos mediante los cuales las proteínas que muestran la propiedad de activar linfocitos NKT específicos de antígeno pueden modificarse mediante sustitución o delección de aminoácidos, eliminando así la capacidad de unirse a CD1d.

La presente invención describe moléculas de factor VIII obtenidas por la metodología descrita en la solicitud PCT PCT/EP2011/070911 que han perdido su capacidad para activar el sistema inmunitario innato y, por consiguiente, muestran una falta o una capacidad significativamente reducida para activar una respuesta inmunitaria adaptativa con la producción de inhibidores. La invención describe además el uso de tales moléculas de factor VIII para el tratamiento de pacientes que necesitan terapia de reemplazo, y en particular pacientes con hemofilia A grave. La presente invención también divulga métodos en los que se puede usar la terapia génica usando moléculas de factor VIII de la presente invención.

#### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la producción de moléculas de factor VIII con inmunogenicidad reducida. La presente invención también se refiere al uso de dichas moléculas de factor VIII para el tratamiento de pacientes que necesitan dicho tratamiento.

La solicitud PCT PCT/EP2011/070911 describe métodos para obtener péptidos o polipéptidos con capacidad reducida para activar linfocitos NKT. Así pues, se hizo el hallazgo inesperado de que una proporción significativa de péptidos o polipéptidos portaba secuencias de aminoácidos que les permitían unirse y ser presentados por determinantes CD1d para la activación de los linfocitos T citolíticos naturales(NKT). La activación de tales células da como resultado la liberación de citocinas y, en algunos casos, la adquisición o el aumento de las propiedades citolíticas.

La presente invención se refiere en un aspecto al uso de al menos un polipéptido aislado usado como un alofactor, que se ha modificado para eliminar al menos dos restos de aminoácidos implicados en la formación de un epítipo reconocido por los linfocitos NKT, para la fabricación de un medicamento para prevenir en un sujeto respuestas inmunitarias a dicho alofactor.

Más específicamente, la presente invención se refiere al factor VIII y al uso del factor VIII como medicamento. El factor VIII es un cofactor del sistema de la coagulación que participa en la activación de la trombina al facilitar la formación de tenasa, una serina esterasa que ensambla el factor VIII, el factor IX y el factor X. El factor X tiene la actividad enzimática que convierte la trombina. En ausencia de factor VIII, la tasa de formación de tenasa se reduce drásticamente, dejando a los pacientes en riesgo de hemorragias espontáneas, que a menudo son potencialmente mortales, y requieren medidas terapéuticas inmediatas. Cuando la concentración de factor VIII está moderadamente reducida (entre 5 y 10 %), los pacientes generalmente sangran solo tras un traumatismo o cirugía.

Los pacientes que sufren hemofilia A grave (menos del 1 % de factor VIII) tienen hemorragias espontáneas frecuentes y requieren tratamiento profiláctico, ya sea en administración continua o una inyección de bolo 2 o 3 veces por semana. Además, los pacientes en los que se observa un aumento del catabolismo del factor VIII, como en el choque séptico, la fibrinólisis aguda, el politraumatismo o la hemorragia cerebral, también necesitan la administración del factor VIII.

#### Definiciones

El término "**péptido**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados mediante enlaces peptídicos, pero que en una realización particular puede comprender estructuras no aminoacídicas (como, por ejemplo, un compuesto orgánico conector. Los péptidos según la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos producidos de manera artificial incorporados mediante síntesis peptídica química o mediante modificación química o enzimática. El término "**polipéptido**" cuando se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente a péptidos más grandes o proteínas.

El término "**epítipo**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una o a varias partes (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína que se reconoce(n) específicamente y se une(n) mediante un anticuerpo o una parte del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito B o T, y que

es capaz, mediante dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

El término "**antígeno**" cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos y/o que comprende epítomos de linfocitos T. Por lo general, dicha macromolécula es una proteína o un péptido (con o sin polisacáridos) o está fabricada con una composición proteica y que comprende uno o más epítomos; como alternativa dicha macromolécula puede denominarse en el presente documento "**proteína antigénica**" o "**péptido antigénico**".

La expresión "**epítomo de células T**" o "**epítomo de linfocitos T**" en el contexto de la presente invención, se refiere a un epítomo de linfocitos T dominante, subdominante o menor, es decir, una parte de una proteína antigénica que es reconocida y unida específicamente por un receptor de la superficie celular de un linfocito T. Si un epítomo es dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria suscitada contra el epítomo. La dominancia depende de la frecuencia a la que dichos epítomos son reconocidos por los linfocitos T y capaces de activarlos, entre todos los posibles epítomos de linfocitos T de una proteína. En particular, un epítomo de linfocitos T es un epítomo unido por moléculas del MHC de clase I o del MHC de clase II.

La expresión "**epítomo de linfocito NKT**" se refiere a una parte de una proteína antigénica que es reconocida y unida específicamente por un receptor de la superficie celular de un linfocito T. En particular, un epítomo de un linfocito NKT es un epítomo unido por moléculas CD1d.

La expresión "**linfocitos CD4+ efectoros**" se refiere a los linfocitos que pertenecen al subconjunto de linfocitos T CD4 positivo cuya función es proporcionar ayuda a otras células, tales como, los linfocitos B. Estas células efectoras se denominan convencionalmente linfocitos Th (de linfocitos T helper), con diferentes subconjuntos tales como linfocitos Th0, Th1, Th2 y Th17.

La expresión "**linfocitos NKT**" se refiere a las células del sistema inmunitario innato caracterizadas por el hecho de que reconocen los epítomos presentados por la molécula CD1d. En el contexto de la presente invención, los linfocitos NKT pueden pertenecer al subconjunto tipo 1 (invariante) (iNKT), o a cualquier otro subconjunto que se active mediante la presentación de epítomos peptídicos por CD1d. La expresión "**linfocitos NKT**" también incluye linfocitos NKT que pertenecen al linaje CD4 o CD8. Los linfocitos NKT a menudo llevan receptores como NK1.1 y NKG2D.

La "**molécula CD1d**" se refiere a una molécula no derivada del MHC constituida por 3 cadenas alfa y un conjunto antiparalelo de cadenas beta dispuestas en un profundo surco hidrófobo abierto en ambos lados y capaz de presentar lípidos, glucolípidos o péptidos hidrófobos a los linfocitos NKT.

La expresión "**trastornos inmunitarios**" o "**enfermedades inmunitarias**" se refiere a enfermedades en las que una reacción del sistema inmunitario es responsable o favorece un mal funcionamiento o una situación no fisiológica en un organismo. Los trastornos inmunitarios en el contexto de la presente invención se refieren a una patología inducida por agentes infecciosos y vigilancia tumoral.

El término "**alofactor**" o "**aloantígeno**" se refiere a una proteína, péptido o factor (es decir, cualquier molécula) que muestra polimorfismo cuando se compara entre dos individuos de la misma especie y, más en general, cualquier proteína, péptido o factor que induce una respuesta inmunitaria (alorreactiva) en el sujeto que recibe el alofactor. Por extensión, los alofactores también incluyen proteínas genéticamente modificadas utilizadas para la alimentación.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona moléculas de factor VIII para prevenir en un sujeto una respuesta inmunitaria hacia dichas moléculas de factor VIII.

El factor VIII tiene una secuencia madura compuesta de 2332 aminoácidos con una estructura de dominio A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, en la cual A1, A2, B, A3, C1 y C2 representan dominios y a1, a2 y a3 representan regiones ácidas que unen dichos dominios. Tras el procesamiento proteolítico, que ocurre después de la secreción, el factor VIII está presente en el plasma en una forma principal que consiste en una longitud variable de A1-a1-A2-a2-B (la longitud está condicionada por la longitud del dominio B) unida no covalentemente a las cadenas ligeras que consisten en A3-C1-C2.

El FVIII acelera la activación del factor X por el factor IX en una superficie de fosfolípidos adecuada, amplificando así el proceso de la coagulación. La forma activa del factor VIII está constituida por un heterotrímero que consiste en A1-a1, A2-a2 y A3-C1-C2.

En particular, la invención proporciona formas de prevenir la expansión y la actividad funcional de los linfocitos NKT. Dichos linfocitos generalmente se clasifican en distintos subconjuntos, concretamente, tipo 1 para los linfocitos NKT que llevan una cadena alfa TCR invariante (Valpha14 en el ratón, Valpha24 en humanos), o linfocitos NKT tipo 2 que presentan un repertorio diverso de cadena alfa y se considera que son específicos para sulfátidos. Sin embargo, la evidencia reciente ha sugerido que los subconjuntos alternativos de linfocitos NKT no encajan en la categoría de tipo

1 o tipo 2. El propósito de la presente invención es incluir estos linfocitos NKT no convencionales, que pueden transportar el correceptor CD4 o CD8. Tras la presentación de un antígeno unido a CD1d, los linfocitos NKT se activan rápidamente y secretan una serie de citocinas que se consideran determinantes para influir en otras células tanto del sistema inmunitario innato como adaptativo. En algunas circunstancias, dichos linfocitos NKT activados adquieren o

En el contexto de la presente invención, realizamos la observación inesperada de que los péptidos pueden ser presentados por la molécula CD1d. Una característica de la molécula CD1d es que está constituida por dos cadenas alfa antiparalelas que forman una hendidura sobre una plataforma constituida por dos cadenas beta antiparalelas. La hendidura es estrecha y profunda y acepta solo restos hidrófobos, que se consideran clásicamente solo lípidos. La hendidura puede acomodar una secuencia de 7 aminoácidos caracterizados como un resto hidrófobo en la posición (P)1 y 7, y un resto alifático en P4. P1 es un resto hidrófobo obligado, tal como F, W, H o Y. Sin embargo, P7 es permisivo y puede contener restos alternativos siempre que no sean polares. Los restos en P4 son preferiblemente alifáticos, pero es opcional. Una secuencia general para un motivo de unión a CD1d es, por lo tanto, [FWTHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY]. Sin embargo, debe quedar claro para los expertos en la materia que el motivo es simétrico y que P7 puede considerarse como P1, y P1 puede considerarse como P7. La secuencia general de un motivo de unión a CD1d se proporciona aquí como una indicación general sin ninguna intención limitante.

La presente invención se refiere a la producción de moléculas de factor VIII y al método de producción de las mismas, conteniendo dichas moléculas motivo(s) de unión a CD1d, que les confieren la capacidad de activar linfocitos NKT y que se modifican por sustitución en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de los restos en P1 y P7 con un resto no hidrófobo, con, opcionalmente, sustitución o delección de restos alifáticos en P4, o cualquier combinación de estos, lo que da como resultado una pérdida o reducción significativa de la capacidad de los péptidos o polipéptidos para unirse a CD1d y, por lo tanto, da como resultado una pérdida o reducción significativa de dichos péptidos o polipéptidos para activar los linfocitos NKT.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una molécula de factor VIII con una estructura de dominio A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, en la cual A1, A2, B, A3, C1 y C2 representan dominios y a1, a2 y a3 regiones ácidas que unen dichos dominios, teniendo dicha molécula de factor VIII una capacidad reducida para activar linfocitos NKT, dichas moléculas de factor VIII se pueden obtener mediante:

- a. identificación en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 de al menos un epítipo de linfocitos NKT en el que dicho epítipo comprende restos de aminoácidos en la posición P1 y/o P7
- b. modificación de dicho(s) epítipo(s) por sustitución de al menos dos restos de aminoácidos hidrófobos en la posición P1 y P7 con un resto no hidrófobo.

La presente invención también se refiere a métodos para obtener una molécula de factor VIII con capacidad reducida para activar linfocitos NKT que comprende las etapas de:

- a. identificación en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 de al menos un epítipo de linfocitos NKT en el que dicho epítipo comprende restos de aminoácidos en la posición P1 y/o P7
- b. modificación de dicho(s) epítipo(s) sustituyendo al menos dos restos de aminoácidos en la posición P1 y P7 con un resto no hidrófobo o añadiendo un resto no hidrófobo en la posición P1 y/o P7.

En la presente invención, los restos de aminoácidos F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 se reemplazan por un resto de aminoácido no hidrófobo, y, opcionalmente, I, L, M o V en la posición P4 se reemplaza por un resto no alifático, o cualquier combinación de estos.

En otra realización particular más, los restos hidrófobos localizados en la posición P1 y/o P7, u, opcionalmente, los restos alifáticos localizados en P4, o cualquier combinación de estos, se reemplazan por al menos un aminoácido no natural diferente del F no natural, W, T, H, Y, o por un compuesto orgánico no aromático.

En una realización preferida, los aminoácidos no naturales son D-aminoácidos.

La presente invención también se refiere a las moléculas de factor VIII que contienen motivo(s) de unión a CD1d, que les confieren la capacidad de activar linfocitos NKT y que son modificados por sustitución en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 de al menos dos restos de aminoácidos hidrófobos en posición P1 y P7 con un resto no hidrófobo, y adicionalmente, por delección de restos alifáticos en P4, o cualquier combinación de estos, lo que da como resultado una pérdida o reducción significativa de la capacidad de los péptidos o polipéptidos para unirse a CD1d y, por lo tanto, da como resultado una pérdida o reducción significativa de dichos péptidos o polipéptidos para activar los linfocitos NKT.

Tras la administración a un sujeto, tales moléculas de factor VIII no se cargan en CD1d y, por lo tanto, no pueden activar los linfocitos NKT.

En un aspecto adicional, la invención también abarca el uso de moléculas de factor VIII que comprenden al menos dos sustituciones de F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para

prevenir en un sujeto una respuesta inmunitaria al factor VIII.

En un aspecto adicional más, la invención también abarca el uso de moléculas de factor VIII que comprenden al menos dos sustituciones de F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para prevenir en un sujeto la activación de linfocitos NKT frente al factor VIII.

En un aspecto adicional más, la invención también abarca el uso de moléculas de factor VIII que comprenden al menos dos sustituciones de F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 para la fabricación de un medicamento para prevenir en un sujeto una respuesta inmunitaria al factor VIII.

El número de motivos de unión a CD1d cuando está presente en un péptido o polipéptido, es muy limitado. Ejemplos de tales péptidos o polipéptidos se proporcionan a continuación para el factor VIII. Normalmente, un polipéptido presenta de uno a cinco de estos motivos.

Una ventaja adicional de la presente invención es que la molécula CD1d presenta un grado muy limitado de polimorfismo. Por lo tanto, es obvio para el experto en la materia que las mismas sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención proporcionan péptidos o polipéptidos útiles para todos o una gran mayoría de sujetos. Esto está en marcado contraste con los motivos de péptidos o polipéptidos que se unen a las moléculas de MHC de clase II, en donde se puede delinear una gran cantidad de péptidos que contienen la secuencia apropiada. Esto se debe a las restricciones mínimas impuestas a los péptidos de unión al MHC de clase II y al gran polimorfismo de las moléculas de clase II.

Las moléculas de factor VIII que son objeto de la presente invención se identifican de la siguiente manera:

(1) opcionalmente, la secuencia de aminoácidos del factor VIII se evalúa por la presencia de al menos un motivo CD1d que contiene un resto hidrófobo en P1 y P7, y un resto alifático en P4. Una secuencia general tal como [FWTHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY] puede utilizarse para usar algoritmos bien conocidos en la técnica. Esta secuencia general debe considerarse como una herramienta de ayuda para la identificación de la secuencia o secuencias en dicho péptido o polipéptido que contiene un motivo que podría permitir que dicho péptido o polipéptido active los linfocitos NKT.

(2) la capacidad del péptido o polipéptido para unirse a CD1d se prueba *in vitro* usando una línea celular que expresa la molécula CD1d. Los ejemplos de tales líneas celulares son conocidos en la técnica y se usan para desarrollar los ejemplos de la presente solicitud (por ejemplo, células JAWS2 y células U937). En una realización preferida, la línea celular no presenta moléculas del MHC de clase II y se transduce para la hiperexpresión de CD1d usando un vector viral que contiene la secuencia de ADN de CD1d o cualquier otro medio conocido en la técnica para introducir un gen en una célula. Los métodos para la transducción celular se conocen en la técnica. La línea celular se carga en cultivo con el péptido o polipéptido, o con un péptido sintético que abarca la secuencia correspondiente. Dichos péptidos sintéticos se producen fácilmente por síntesis, utilizando, por ejemplo, la síntesis de fase sólida fmoc bien conocida en la técnica. La presentación eficiente del péptido, polipéptido o péptido sintético correspondiente por la molécula CD1d se evalúa a continuación midiendo la activación de los linfocitos NKT. Dichas células pueden obtenerse de la sangre periférica, por ejemplo, mediante clasificación magnética y mantenerse en cultivo, en presencia de citocinas como IL-2, IL-15 o IL-7. Estos métodos se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Godfrey et al, Nature reviews Immunology 2010, 11: 197-206). La activación de los linfocitos NKT se evalúa utilizando métodos como la evaluación de la producción de citocinas.

Como alternativa, los péptidos realmente presentados por las células presentadoras de antígeno en las moléculas CD1d pueden eluirse y separarse mediante diversos métodos de cromatografía. La descripción completa de dicha metodología se encontrará en Scott et al, Immunity, 12: 711-720, 2000. Dichos péptidos se secuencian a continuación para identificar los restos de aminoácidos que se encuentran en P1 y P7. Como alternativa, dichos péptidos sintéticos pueden cargarse en dímeros, tetrámeros o polímeros de la molécula CD1d para detectar linfocitos NKT específicos de dicho péptido. Una posibilidad es usar tetrámeros marcados con fluorescencia y detección usando un sistema de clasificación celular activado por fluorescencia (facs).

(3) las secuencias de aminoácidos identificadas como capaces de activar linfocitos NKT y, opcionalmente, identificadas por algoritmos, se modifican a continuación por sustitución. F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 se reemplazan por al menos un aminoácido diferente de F, W, T, H, Y. Los aminoácidos naturales pueden modificarse mediante modificaciones postranscripcionales o sustituirse con grupos químicos como grupos metilo. En otra realización preferida, F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y/o P7 se reemplazan por cualquier aminoácido no natural alternativo adecuado. Ejemplos de restos de aminoácidos no naturales son los D-aminoácidos. En otra realización preferida, F, W, T, H o Y en la posición P1 se reemplaza por al menos un aminoácido diferente de F, W, T, H, Y, por cualquier aminoácido no natural alternativo adecuado o por un compuesto orgánico no aromático. Dicha sustitución de aminoácidos se obtiene usando métodos bien conocidos en la técnica. En otra realización particular más, se añade al menos un aminoácido dentro del motivo de unión a CD1d, en cualquier ubicación dentro de la secuencia P1 a P7.

(4) opcionalmente, puede ser ventajoso reemplazar los restos de aminoácidos hidrófobos adyacentes a la primera

posición (P1) y/o a la última posición (P7) por restos no hidrófobos. Dichos restos hidrófobos pueden estar localizados dentro de las regiones flanqueantes del epítipo o dentro de la propia secuencia del epítipo en las posiciones P2 o P6). Las posiciones P-2 y P-1, P2 y/o P6, P8 y P9, localizadas en el extremo amino terminal o el extremo carboxilo terminal del epítipo, respectivamente, están ventajosamente ocupadas por restos no hidrófobos, es decir, aminoácidos diferentes de F, W, T, H o Y, que reducen aún más la afinidad del epítipo por CD1d y, por lo tanto, la capacidad del epítipo para activar los linfocitos NKT.

(5) Los linfocitos NKT se prueban a continuación para determinar su reactividad con los péptidos modificados como se describe en (3). Como alternativa, la proteína de longitud completa de la que se deriva el péptido se puede producir con la modificación de la secuencia como se describe en (3). Se pueden usar varios métodos para determinar si los linfocitos NKT han perdido o han reducido su capacidad de reaccionar al péptido o proteína modificados. Estos métodos son conocidos en la técnica. La proliferación de los linfocitos NKT puede evaluarse mediante la incorporación de timidina radioactiva, o evaluando la concentración de citocinas producidas en el medio de cultivo. Como alternativa, los linfocitos NKT pueden ser evaluados por ELISPOT usando una variedad de anticuerpos dirigidos contra las citocinas o moléculas asociadas con las propiedades citolíticas de las células, como la granzima B. Como alternativa, los linfocitos NKT pueden evaluarse para detectar eventos de señalización temprana, como la fosforilación de Fyn o marcadores de activación de superficie.

En particular, el análisis de la secuencia del dominio A1 del factor VIII ha identificado dos regiones que contienen motivos que permiten que el factor VIII se una a la molécula CD1d, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Estas 2 regiones abarcan los restos de aminoácidos 190 a 209 y 309 a 323 y preferiblemente 309 a 316, con secuencia:

190-209: QTLHKEFILLFAVFDEGKSWH (SEQ ID1)

309-323: FCHISSHQHDGMEAY (SEQ ID2)

Los restos de aminoácidos hidrófobos están subrayados y cada una de las 2 secuencias contiene 2 motivos de unión a CD1d, concretamente:

H193-F199

F195-V201 (P7 es permisivo y puede acomodar valina)

F309-H315

H317-Y323

De acuerdo con la presente invención, los medicamentos están previstos para el tratamiento de enfermedades en las que se requiere la administración de factor VIII, como en la deficiencia congénita o adquirida del factor VIII, y en trastornos en los que es beneficioso administrar el factor VIII, como en los trastornos hemorrágicos asociados con el consumo agudo de factor VIII como se observa en el choque séptico, los politraumatismos y la fibrinólisis aguda, o en hemorragias no controladas asociadas con hemorragia cerebral.

El medicamento de la invención es normalmente, aunque no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende como principio activo al menos una de las moléculas de factor VIII de la invención o un vector terapéutico génico capaz de expresar dichas moléculas de factor VIII. Además del principio, o de los principios activos, dicha formulación comprenderá al menos uno de un diluyente (farmacéuticamente aceptable).

En general, la administración de moléculas de factor VIII de la invención evita la activación del sistema inmunitario innato, más particularmente la activación de linfocitos NKT, más particularmente la producción de citocinas asociadas con la activación de linfocitos NKT.

La identificación de un epítipo de linfocitos NKT en el contexto de la presente invención es conocida por un experto en la materia. Por ejemplo, las secuencias peptídicas aisladas de la molécula de factor VIII se prueban, por ejemplo, mediante técnicas de biología de linfocitos NKT, para determinar si las secuencias peptídicas provocan una respuesta de linfocitos T. Las secuencias peptídicas que provocan una respuesta de linfocitos NKT se definen como que tienen actividad estimulante de linfocitos NKT. La actividad estimuladora de linfocitos NKT humanos puede analizarse además realizando cultivos de linfocitos NKT obtenidos de un individuo sensibilizado al factor VIII y determinando si se produce la proliferación de linfocitos NKT en respuesta al péptido/epítipo según se mida, por ejemplo, por captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación de las respuestas de los linfocitos NKT a los péptidos/epítopos pueden calcularse como las CPM máximas en respuesta a un péptido/epítipo dividido por la CPM del control. Un índice de estimulación (I.E.) de linfocitos NKT igual a o mayor que dos veces el nivel base se considera "positivo". Los resultados positivos se utilizan para calcular el índice de estimulación medio de cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítopos analizado. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de linfocitos NKT mayor o igual a 2 se considera útil como candidato para llevar a cabo la sustitución o delección de restos de aminoácidos hidrófobos como se describe en la presente invención.

Se dice que un péptido o polipéptido de la invención tiene una capacidad reducida para activar los linfocitos NKT cuando el I.E. es inferior a dos veces el nivel de fondo, o cuando los niveles de citocinas producidas tras la estimulación

son inferiores al 50 % de las producidas cuando se lleva a cabo la estimulación con la secuencia de péptido o polipéptido natural, o cuando los niveles de agentes citolíticos como la granzima B se reducen al menos dos veces en comparación con los péptidos o polipéptidos de secuencia natural.

- 5 Las moléculas de CD1d solubles se obtienen y se hacen tetraméricas por síntesis y/o acoplamiento químico. La molécula CD1d se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas CD1d solubles se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido según su fuerte afinidad de unión para dicha molécula CD1d. Los péptidos que han de evaluarse para la unión a CD1d se incuban después en diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su sitio de unión a CD1d mediante la adición de neutravidina.
- 10 Estos métodos pueden encontrarse, por ejemplo, en Texier et al., (2000) J. Immunology 164, 3177-3184) para los péptidos presentados por determinantes del MCH de la clase II, pero el método puede aplicarse fácilmente a epítomos de linfocitos NKT restringidos a CD1d.

- 15 Si se descubre que dos o más secuencias de aminoácidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia de péptido o polipéptido nativa tienen actividad estimuladora de los linfocitos NKT, tal y como se determina mediante las técnicas de biología de linfocitos T, se puede llevar a cabo la mutación o delección de restos de aminoácidos hidrófobos de los restos perteneciente a una o ambas secuencias.

- 20 La vía de administración para las moléculas de factor VIII de la presente invención puede variar según la indicación. Los ejemplos son la inyección intravenosa o subcutánea de factor VIII, pero la presente invención también abarca vías alternativas de administración tales como intranasal, oral, sublingual, percutánea o intramuscular.

- 25 Las moléculas de factor VIII de la presente invención pueden producirse usando métodos conocidos en la técnica para la producción de proteínas recombinantes usando sistemas de expresión tales como células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células vegetales o células de mamíferos.

- 30 Las moléculas de factor VIII de la invención pueden producirse mediante expresión recombinante en, por ejemplo, células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*), células de levadura (por ejemplo, especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* o de *Schizosaccharomyces*), células de insecto (por ejemplo, de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células vegetales o células de mamífero (por ejemplo, células CHO y COS). La construcción de los vectores de expresión adecuados así requeridos (incluyendo otra información, tal como las secuencias promotora y de terminación) implica por otra parte el uso de técnicas de ADN recombinante convencionales. Las moléculas de factor VIII de la invención producidas de manera recombinante, pueden proceder de una proteína precursora más grande, por ejemplo, mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimáticos insertados adyacentes al N y/o C terminal del péptido o polipéptido, seguido de purificación adecuada.
- 35

- La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas de factor VIII de la presente invención y a los métodos para su uso, por ejemplo, para la expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico son capaces de expresar moléculas de factor VIII de la invención.
- 40

- En la terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican las moléculas de factor VIII de la presente invención pueden utilizarse como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para su suministro a las células diana. Los expertos en la materia conocen bien otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico al interior de células y su uso en terapia génica humana, e implican el direccionamiento del ADN hacia los receptores de las células, formando un complejo del ADN plasmídico con proteínas. En su forma más simple, la transferencia génica puede realizarse inyectando simplemente cantidades minúsculas de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que se han introducido los genes recombinantes en una célula, estos pueden reconocerse mediante los mecanismos normales celulares para la transcripción y la traducción, y pueden expresar un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en un gran número de células. Estos métodos incluyen: transfección, en la que el ADN se precipita con fosfato de calcio y es captado por las células mediante pinocitosis; electroporación, en la que las células están expuestas a grandes impulsos de voltaje para crear orificios en la membrana; lipofección/fusión de liposomas, en la que el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas utilizando ADN unido a pequeños proyectiles. Otro método para introducir ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas modificadas químicamente.
- 50 Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar los endosomas y mejorar la captación del ADN en las células. La mezcla de adenovirus a soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a polilisina fijada covalentemente a adenovirus utilizando agentes reticulantes de proteínas, mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante. Los vectores de virus adenoasociados pueden utilizarse también para la administración de genes. Como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el proceso de introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en una célula, lo que habitualmente se realiza para posibilitar la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, un polipéptido, ADN y ARN antisentido o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede realizarse en células cultivadas o por administración directa a mamíferos. En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de factor VIII según la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de tal modo que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa solo en un tejido específico. En la materia se conocen bien métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido, por
- 65

ejemplo, colocando la secuencia que codifica la molécula de factor VIII de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión de dicha molécula específicamente a uno o más tejidos u órganos. Los vectores de expresión que proceden de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de ARN o virus del papiloma bovino, pueden utilizarse para el suministro de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos según la invención en los tejidos diana o en la población de células diana. Los métodos bien conocidos por los expertos en la materia pueden utilizarse para construir vectores víricos recombinantes que contengan dichas secuencias codificantes. Como alternativa, las células modificadas genéticamente que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido según la invención pueden utilizarse en terapia génica.

El factor VIII de la presente invención puede modificarse por métodos conocidos en la técnica.

Las moléculas del factor VIII pueden abarcar toda la secuencia de aminoácidos del factor VIII o solo partes de ella. Un ejemplo lo proporcionan las moléculas de factor VIII con dominio B eliminado. El dominio B es prescindible para la función del factor VIII y, por lo tanto, puede eliminarse sin afectar a la función del factor VIII. Los dominios a2 y a3 generalmente están unidos por una secuencia de aminoácidos que puede ser artificial o puede representar secuencias del dominio B en sí. Las moléculas del factor VIII pueden modificarse mediante la adición y/o sustitución de aminoácidos para aumentar la estabilidad del factor VIII, por ejemplo, reduciendo la tasa de unión específica del dominio A2, o aumentando la resistencia del factor VIII a las enzimas proteolíticas. Las moléculas del factor VIII pueden estabilizarse mediante el acoplamiento a la parte Fcgamma de los anticuerpos, por ejemplo, para aumentar su reciclaje a través del receptor FcRn. El factor VIII puede estabilizarse reduciendo su degradación utilizando restos de polietilenglicol (derivados de PEG) o una sustitución química alternativa. Todas estas modificaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención.

La técnica anterior (Swaroop et al., The Journal of Biological Chemistry, vol 272, pp 24121-24124, 1997; Cerullo et al., Molecular Therapy, vol 15, pp. 2080-2087, 2007) ha identificado que la mutación de F309 (SEQ ID2) aumenta la tasa de producción de moléculas de factor VIII por los linfocitos transfectados con una construcción de factor VIII. Cerullo et al., observaron una reducción no significativa de la producción de anticuerpos inhibidores en ratones con factor VIII inactivado tratados con el mutante F309, alejando al experto en la materia del uso de dicho mutante para reducir la inmunogenicidad del factor VIII. Además, en dicha técnica anterior, no se menciona que F309 pudiera ser parte de un motivo de unión a CD1d.

El medicamento de la invención es normalmente, pero no necesariamente una formulación (farmacéutica) que comprende, como principio activo, al menos una molécula de factor VIII de la invención, un vector terapéutico génico capaz de expresar dicha molécula de factor VIII. Además del principio, o de los principios activos, dicha formulación comprenderá al menos uno de un diluyente (farmacéuticamente aceptable). Por lo general, se pueden encontrar otras sales farmacéuticamente aceptables en, por ejemplo, un manual de Farmacopea (por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos, Europa o Internacional). El medicamento o la composición farmacéutica de la invención comprende normalmente una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del ingrediente, o de los ingredientes, activo(s), en la que la eficacia es relativa a la afección o trastorno que ha de prevenirse o tratarse.

El medicamento o la composición farmacéutica de la invención puede, en una realización preferida, tener que administrarse a un sujeto que lo necesite como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprende administraciones múltiples de dicho medicamento o composición. Dichas administraciones múltiples normalmente se producen consecutivamente, y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del principio activo y a la naturaleza de la afección que ha de prevenirse o tratarse. La cantidad de principio activo proporcionada a un sujeto que lo necesite en una única administración también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (como, por ejemplo, peso edad), el estado de la afección que ha de prevenirse o tratarse, y la experiencia del médico, facultativo o sanitario que lo esté tratando.

El término "diluyentes" se refiere, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier material o sustancia con la que se formula el principio activo para facilitar su aplicación o diseminación en el lugar que se va a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin alterar su eficacia. Esta expresión incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del principio activo en la composición. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se haya comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de la presente invención pueden usarse de manera adecuada como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos finos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, bolitas o polvos. Los transportadores farmacéuticamente aceptables para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidos por los expertos en la materia, y no existe una restricción particular en su selección en la presente invención. También pueden incluir aditivos, tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, apelmazantes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre que los mismos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir, transportadores y aditivos que no creen un daño permanente en los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier modo conocido, por ejemplo,

mezclando homogéneamente, recubriendo y/o triturando los principios activos, en un procedimiento de una etapa o de múltiples etapas, con el material transportador seleccionado y, cuando sea adecuado, los demás aditivos, tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse mediante micronización, por ejemplo, con el objetivo de obtenerlos en forma de microesferas que tienen normalmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10 µm, concretamente, para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los principios activos. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Para ilustrar la invención se proporcionan los siguientes ejemplos. Sin embargo, no hay intención de limitar la invención a tales ejemplos.

#### **Ejemplo 1:**

##### Unión del péptido de la SEQ ID1 a los tetrámeros de CD1d

Se obtuvo por síntesis química un péptido que abarca la SEQ ID1. Este péptido se usó para cargar tetrámeros de CD1d (ProImmune) mediante incubación durante la noche.

Los linfocitos NKT se prepararon a partir del bazo de ratones no sometidos previamente a experimentación mediante agotamiento de todos los linfocitos CD4(-) usando perlas magnéticas.

Los linfocitos CD4+ se incubaron a continuación con tetrámeros de CD1d cargados con el péptido de SEQ ID1 (P28 WT en la Figura 1), que corresponde a la secuencia de aminoácidos 190 a 209.

La Figura 1 muestra que se detectó  $\pm 1$  % de los linfocitos T CD4+. Adicionalmente, el péptido de SEQ ID1 se separó en 2 partes y se produjeron los péptidos sintéticos que abarcan la secuencia 190-200 (SEQ ID3, P28 A en la Figura 1) y 200-210 (SEQ ID4, P28 B en la Figura 1).

La secuencia del péptido de la SEQ ID3 es:

QTLHKFILLFA (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 190 a 200)

La secuencia del péptido de la SEQ ID4 es:

AVFDEGKSWHS (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 200 a 210)

La figura indica que un motivo de unión a CD1d principal se encuentra localizado en la SEQ ID3, y un porcentaje limitado aunque significativo de linfocitos NKT fue detectado por el péptido de la SEQ ID4.

Por lo tanto, se concluyó que un motivo de unión a CD1d principal estaba localizado en el péptido de la SEQ ID3.

#### **Ejemplo 2:**

##### Activación de linfocitos NKT por inmunización con células JAWS2 cargadas con el péptido de SEQ ID1

Las células JAWS2 expresan CD1d pero no los determinantes del MHC de clase II. Estas células se usaron para demostrar que la presentación del péptido de SEQ ID1 puede ocurrir a través de CD1d.

Las células JAWS2 se incubaron durante 2 h a 37 °C con péptido de SEQ ID1 (10 µg/ml) y se lavaron completamente dos veces. A continuación, las células se trataron con mitomicina para bloquear la división celular y se lavaron 4 veces para eliminar la mitomicina. Se inyectó por vía intraperitoneal una suspensión de células que contenía  $2 \times 10^6$  en suero fisiológico en cada una de una serie de 3 ratones no sometidos previamente a experimentación y con factor VIII inactivado. Como control, 3 ratones no sometidos previamente a experimentación y con factor VIII inactivado recibieron el mismo número de células JAWS2 que no habían sido incubadas con el péptido de la SEQ ID1.

Cinco días después de la inyección IP, se sacrificaron los ratones y se preparó su bazo como se indicó anteriormente usando perlas magnéticas para eliminar todos los linfocitos CD4(-).

Los linfocitos CD4+ se incubaron a continuación con tetrámeros cargados con péptido de SEQ ID1.

La Figura 2 muestra que un porcentaje significativo de linfocitos NKT (8 %) presentes en el repertorio natural son específicos del péptido de SEQ ID1 y que dicho porcentaje se duplica (16 %) cuando las células JAWS2 presentan el péptido de SEQ ID1.

La especificidad de la detección de linfocitos NKT se muestra por la falta de detección de NKT con tetrámeros no cargados, así como cuando los tetrámeros se cargaron con un péptido no relacionado con el péptido de la SEQ ID1.

Por lo tanto, se concluyó que la presentación del péptido de SEQ ID1 se producía a través de la presentación de CD1d y que esta presentación fue suficiente para unir y activar los linfocitos NKT.

#### **Ejemplo 3:**

La administración del factor VIII mutado reduce la formación de anticuerpos contra el factor VIII

Para determinar si la mutación dirigida a eliminar los motivos de unión a CD1d en el factor VIII podría reducir la concentración de anticuerpos anti-factor VIII, se clonó el factor VIII de tipo silvestre o mutado en el plásmido pGC5AM-EN. Se introdujeron mutaciones en las posiciones F309 y H315, cada vez en una alanina, en la secuencia del factor VIII mediante PCR y la tecnología de empalme por extensión de solapamiento (SOE-PCR).

Los plásmidos que contienen la secuencia nativa o mutada se verificaron mediante secuenciación y se prepararon mediante maxiprep.

Los plásmidos (100 µg en 2 ml) se administraron directamente a ratones C57BL/6 no sometidos previamente a experimentación y con factor VIII inactivado (3 ratones por grupo) usando el método de presión hidrodinámica (inyección realizada en menos de 7 segundos), conocida en la técnica para dirigir los plásmidos esencialmente al hígado. Los ratones de control se inyectaron usando el mismo método pero con plásmido desnudo (n=3).

Se realizaron un total de 3 inyecciones a intervalos de 10 días.

Diez días después de la última inyección, las concentraciones plasmáticas de anticuerpos contra el factor VIII y la concentración de anticuerpos que inhiben la función del factor VIII se midieron mediante ELISA y ensayo cromogénico, respectivamente.

La Figura 3a indica que se observó una reducción de 3,6 veces de anticuerpos en ratones inyectados con el factor VIII mutante F309A-H315A. La Figura 3b muestra una reducción de 3,8 veces de anticuerpos que inhiben la función del factor VIII.

Estos datos mostraron que la eliminación de un único motivo de unión a CD1d en la molécula del factor VIII es suficiente para reducir significativamente la concentración de anticuerpos específicos, incluidos los que inhiben la función del factor VIII.

**Ejemplo 4:**

Aumento de la expresión de CD1d en células presentadoras de antígeno humanas tras la incubación con un péptido que contiene un motivo de unión a CD1d

Para determinar si las células presentadoras de antígeno humanas tenían la capacidad de procesar y presentar un epítipo peptídico en el contexto de la molécula CD1d, se usó la línea celular de macrófagos humanos U937. Dichas células no expresan complejos de histocompatibilidad mayor de la clase II y se utilizan para evaluar la presentación por CD1d.

El porcentaje de células U937 en reposo que expresan CD1d es bajo según se detecta con un anticuerpo anti-CD1d específico. Se razonó que, si las células U937 se incubaban con un péptido que tiene el motivo de secuencia que le permite unirse a CD1d, entonces esto debería ser detectable por una mayor expresión de CD1d en la superficie celular. Como se observó para los péptidos que abarcan epítopos del MHC de la clase II, la unión de un péptido estabiliza la conformación de la molécula (clase II o CD1d en el presente caso), permitiendo que el complejo se ancle en la superficie celular y reduzca su reciclaje intracelular.

Las células U937 ( $7 \times 10^5$  células) se incubaron durante 24h a 37 °C con 5 µg de péptido que abarca motivos de unión a CD1d o controles. A continuación las células se lavaron y se incubaron con anticuerpos marcados con fluorescencia específicos de CD1d y se evaluó el número de células positivas usando un sistema FACS.

La Figura 4 muestra que el porcentaje de células que expresan CD1d aumenta desde 6 % en los experimentos de control hasta 13 % cuando se usaban péptidos que contienen secuencias de unión a CD1d. Los datos mostrados como histogramas son las medias de mediciones por triplicado, con un asterisco que identifica resultados significativamente más altos que los valores de control ( $p < 0,05$ ).

Los controles incluyen (de izquierda a derecha) células U937 no cargadas, células incubadas con alfa-gal-ceramida y un epítipo restringido de clase II convencional (MHCII-MOG). El experimento incluye secuencias del factor VIII de origen humano (ID SEQ5) o de ratón (ID SEQ 6) correspondientes a los aminoácidos 188-204 de la secuencia del factor VIII.

Por lo tanto, se concluyó que las células presentadoras de antígeno humanas estabilizan los complejos de péptidos y CD1d en su superficie cuando se incuban con dichos péptidos.

**Ejemplo 5:**

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas contienen linfocitos NKT específicos de epítopos

peptídicos unidos a CD1d

Para establecer si las CMSP humanas contenían células que reaccionan con un epítipo peptídico de unión a CD1d, se prepararon linfocitos NKT invariantes (iNKT) a partir de una capa leucocitaria usando perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico de la cadena Valpha24-Jalpha18 del receptor de linfocitos T (llamada cadena invariante).

Dichos linfocitos iNKT humanos ( $10^5$ /condición) se incubaron a continuación con células U937 tratadas con mitomicina C (Relación 1:1) cargadas con 5 µg de péptido que abarca los restos de aminoácidos 188-204 del factor VIII humano (ID SEQ 5) o con péptido control (MHCII-MOG). La incubación se realizó durante 2 semanas a 37 °C en RPMI que contenía 10 % de suero de ternera fetal y 50 U/ml de IL-2 humana recombinante.

Las placas de cultivo se examinaron a simple vista para detectar la presencia de grupos de células. Se observa que se forman grupos de células con U937 cargadas con péptido de ID SEQ 5 en la misma medida que con alfa-gal-ceramida, pero no con péptido de control (MHCII-MOG). La [Figura 5](#) ilustra el promedio de tres recuentos de campo microscópico de esta observación (mínimo 10 células/grupo).

Por lo tanto, se concluyó que el repertorio de células periféricas humanas contiene células definidas como linfocitos NKT de cadena invariante que reaccionan con un péptido presentado por CD1d.

**Ejemplo 6:**

Los restos flanqueantes localizados fuera de la hendidura de unión a CD1d son importantes para una presentación eficiente de la superficie celular

El experimento que se muestra en el Ejemplo 1 indica que un péptido de la SEQ ID 3, correspondiente a los aminoácidos del factor VIII humano 190-200, se une a los tetrámeros de CD1d y permite la detección de linfocitos NKT, lo que indica que esta secuencia contenía el motivo de unión mínimo a CD1d. Para determinar si este motivo era suficiente para una presentación eficiente por las células, el experimento que se muestra en el Ejemplo 4 se repitió con el péptido de la SEQ ID 3.

La [Figura 6](#) muestra que el péptido de SEQ ID 3 no aumentó la expresión de CD1d en la superficie de las células U937, en comparación con los péptidos de SEQ ID 5 mostrados en la [Figura 4](#).

Por lo tanto, se concluye que una carga eficiente *in vivo* de un péptido que contiene un motivo de unión a CD1d requiere la presencia de restos flanqueantes localizados fuera de la hendidura de CD1d.

**Ejemplo 7:**

Los linfocitos NKT específicos del epítipo del factor VIII de unión a CD1d pertenecen a los linajes CD4+ y CD8+

Para determinar el linaje celular al que pertenecían los linfocitos NKT, se realizó un experimento como se describe en el Ejemplo 2. Así pues, las células JAWS2 se cargaron o con péptido de SEQ ID 3, factor VIII con dominio B eliminado, alfa-gal-ceramida o se mantuvieron sin cargar antes de la inyección intraperitoneal (IP) en ratones con factor VIII inactivado ( $2 \times 10^6$  células por ratón). Cinco días después de las inyecciones intraperitoneales, los ratones fueron sacrificados y se prepararon los esplenocitos. Las suspensiones celulares se hicieron reaccionar a continuación con tetrámeros de CD1d no cargados o cargados con péptido de SEQ ID3 o con alfa-gal-ceramida.

Para el análisis por FACS, las células que se unían a los tetrámeros de CD1d se marcaron con anticuerpos específicos de DX5 y CD160 y anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8. La tabla resume los resultados.

|                |       |                 | DX5/CD160       | Número de células ( $\times 10^3$ ) |      |
|----------------|-------|-----------------|-----------------|-------------------------------------|------|
|                |       |                 | Tetrámeros      | CD4+                                | CD8+ |
| 1              | JAWS2 | (-)             | (-)             | 0,3                                 | 0,1  |
| (continuación) |       |                 |                 |                                     |      |
|                |       |                 | DX5/CD160       | Número de células ( $\times 10^3$ ) |      |
| 2              |       |                 | Alfa-gal-cer    | 1,2                                 | 1,3  |
| 3              |       |                 | Péptido SEQ ID3 | 39                                  | 3,5  |
| 4              | JAWS2 | Péptido SEQ ID3 | (-)             | 0,2                                 | 0,1  |
| 5              |       |                 | Alfa-gal-cer    | 2,2                                 | 0,8  |
| 6              |       |                 | Péptido SEQ ID3 | 47                                  | 4,1  |
| 7              | JAWS2 | Factor VIII     | (-)             | 0,1                                 | 0,5  |
| 8              |       |                 | Alfa-gal-cer    | 1,9                                 | 1,4  |

|    |       |              |                 |     |     |
|----|-------|--------------|-----------------|-----|-----|
| 9  |       |              | Péptido SEQ ID3 | 62  | 11  |
| 10 | JAWS2 | Alfa-gal-cer | (-)             | 0,1 | 0   |
| 11 |       |              | Alfa-gal-cer    | 2,3 | 1,8 |
| 12 |       |              | Péptido SEQ ID3 | 46  | 1,9 |

Estos experimentos muestran que

- 5 • el repertorio natural de linfocitos NKT contiene un número significativo de células que reaccionan al péptido de ID SEQ 3 en los linajes CD4+ y CD8+ (fila 3)
- esta población de células puede expandirse aún más mediante inmunización con péptido de SEQ ID3, de nuevo en ambos linajes CD4+ y CD8+ (fila 6)
- 10 • la inmunización con factor VIII es incluso más eficaz en la expansión de estas poblaciones celulares (fila 9)
- la inmunización con alfa-gal-ceramida aumenta ligeramente el número de linfocitos T CD4+ específicos del péptido de SEQ ID3, pero no el número de linfocitos T CD8+
- 15 En conjunto, estos resultados indican que la inmunización con factor VIII provoca una expansión de las células que pertenecen al linaje NKT del fenotipo CD4+ y CD8+.

Secuencias

- 20 ID1 QTLHKFILLFAVFDEGKSWH (humano 190-209)
- ID2 FCHISSHQHDGMEAY (humano 309-323)
- ID3 QTLHKFILLFA (humano 190-200)
- ID4 AVFDEGKSWHS (humano 200-210)
- ID5 KTQTLHKFILLFAVFDE (humano 188-204)
- 25 ID6 RTQMLYQFVLLFAVFDE (ratón 188-204)

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> IMNATE SARL
  - 30 <120> Factor VIII
  - <130> PAT66333PC00
  - 35 <150> EP12168800.6
  - <151> 2012-05-22
  - <160> 6
  - 40 <170> BiSSAP 1.2
  - <210> 1
  - <211> 20
  - <212> PRT
  - 45 <213> Homo sapiens
  - <400> 1
- Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Trp His  
 20
- 50 <210> 2
  - <211> 15
  - <212> PRT
  - <213> Homo sapiens
  - 55 <400> 2

# ES 2 751 361 T3

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Phe | Cys | His | Ile | Ser | Ser | His | Gln | His | Asp | Gly | Met | Glu | Ala | Tyr |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

5

<210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

|  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  |  | Gln | Thr | Leu | His | Lys | Phe | Ile | Leu | Leu | Phe | Ala |
|  |  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 4

|  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  |  | Ala | Val | Phe | Asp | Glu | Gly | Lys | Ser | Trp | His | Ser |
|  |  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

20

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 5

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Lys | Thr | Gln | Thr | Leu | His | Lys | Phe | Ile | Leu | Leu | Phe | Ala | Val | Phe | Asp |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Glu

30

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus <ratón, género>

35

<400> 6

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Arg | Thr | Gln | Met | Leu | Tyr | Gln | Phe | Val | Leu | Leu | Phe | Ala | Val | Phe | Asp |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Glu

# REIVINDICACIONES

1. Una molécula de factor VIII con una estructura de dominio A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, en la cual A1, A2, B, A3, C1 y C2 representan dominios y a1, a2 y a3 regiones ácidas que unen dichos dominios, teniendo dicha molécula de factor VIII una capacidad reducida para activar los linfocitos NKT y que se puede obtener por:
  - a. identificación de al menos un epítipo de linfocitos NKT en donde dicho motivo de epítipo es [FWTHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[IL-MV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY];
  - b. modificación de dicho(s) epítipo(s) por sustitución del aminoácido F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 con un resto de aminoácido no hidrófobo, en donde al menos uno de dichos epítipos de linfocitos NKT está localizado dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
2. La molécula de factor VIII de la reivindicación 1 **caracterizada por que** dicho epítipo de linfocitos NKT comprende un resto alifático en P4 y dicho resto alifático es I, L, M.
3. La molécula de factor VIII de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** al menos un F, W, T, H, Y en la posición P1 y/o P7 está sustituido por al menos un aminoácido natural no hidrófobo, un aminoácido no natural o restos de aminoácidos no aromáticos en donde dicho aminoácido es diferente de F, W, T, H, Y.
4. La molécula de factor VIII de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos un resto de aminoácido hidrófobo localizado en las posiciones P-2, P-1, P2, P6, P8 y/o P9, adyacente a las posiciones P1 y/o P7 está reemplazado por restos de aminoácidos no hidrófobos.
5. La molécula de factor VIII de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizada por que** dicha molécula se modifica adicionalmente por delección del dominio B.
6. La molécula de factor VIII de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizada por que** dicha molécula se produce por expresión recombinante.
7. Moléculas de factor VIII de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6 o una secuencia de ácido nucleico que codifica dichas moléculas de factor VIII para su uso como un medicamento.
8. Moléculas de factor VIII de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso como un medicamento en el tratamiento de la hemofilia A congénita o adquirida, o en el tratamiento de pacientes con trastornos hemorrágicos, tales como choque séptico, fibrinólisis aguda, politraumatismo o hemorragia cerebral.
9. Un método para reducir la inmunogenicidad de una molécula de factor VIII que comprende las etapas de:
  - a. identificación de al menos un epítipo de linfocitos NKT en donde dicho motivo de epítipo es [FWTHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[IL-MV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY];
  - b. modificación de dicho(s) epítipo(s) por sustitución del aminoácido F, W, T, H o Y en las posiciones P1 y P7 con un resto de aminoácido no hidrófobo, en donde al menos uno de dichos epítipos de linfocitos NKT está localizado dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
10. El método de la reivindicación 9 en donde al menos un resto de aminoácido hidrófobo localizado en las posiciones P-2, P-1, P2, P6, P8 y/o P9, adyacente a las posiciones P1 y/o P7 está reemplazado por restos de aminoácidos no hidrófobos.

Figura 1

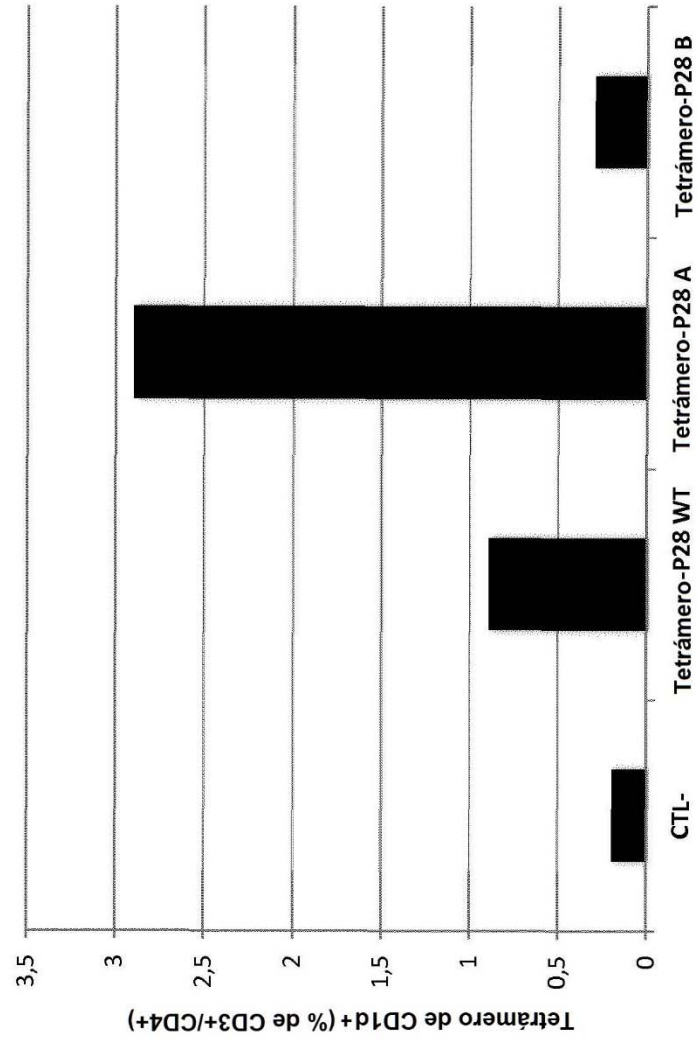


Figura 2

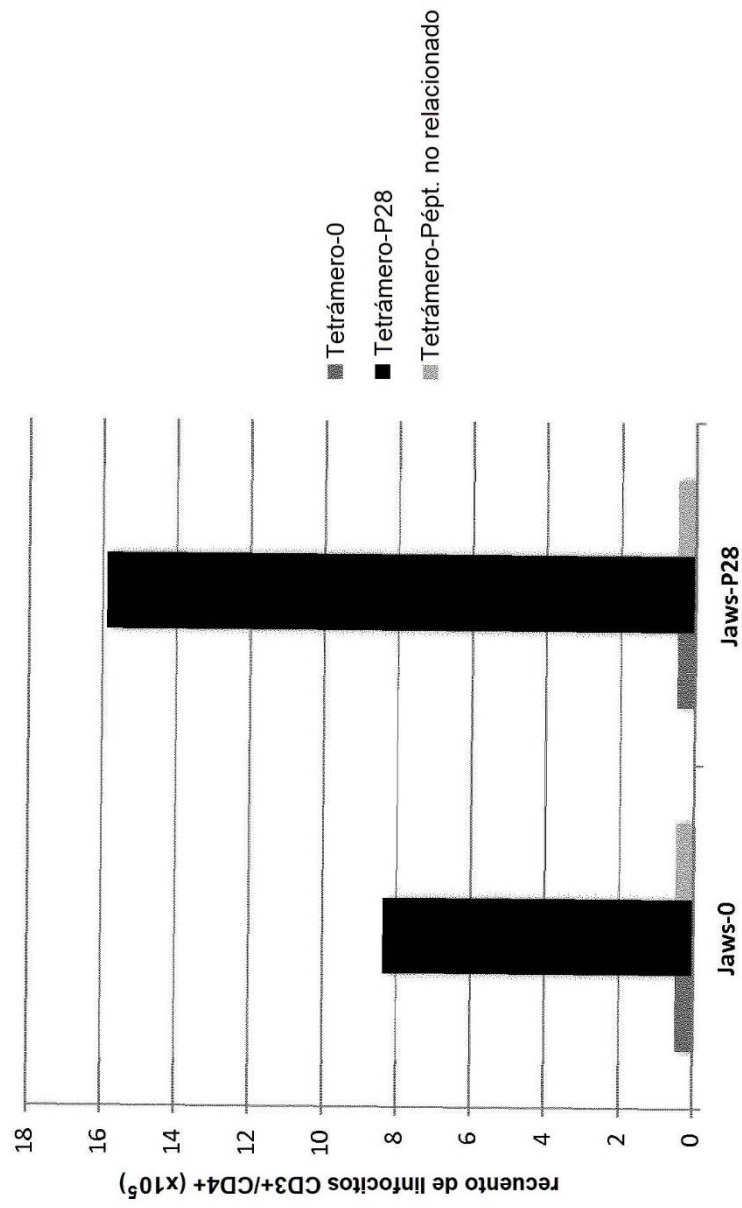


Figura 3a

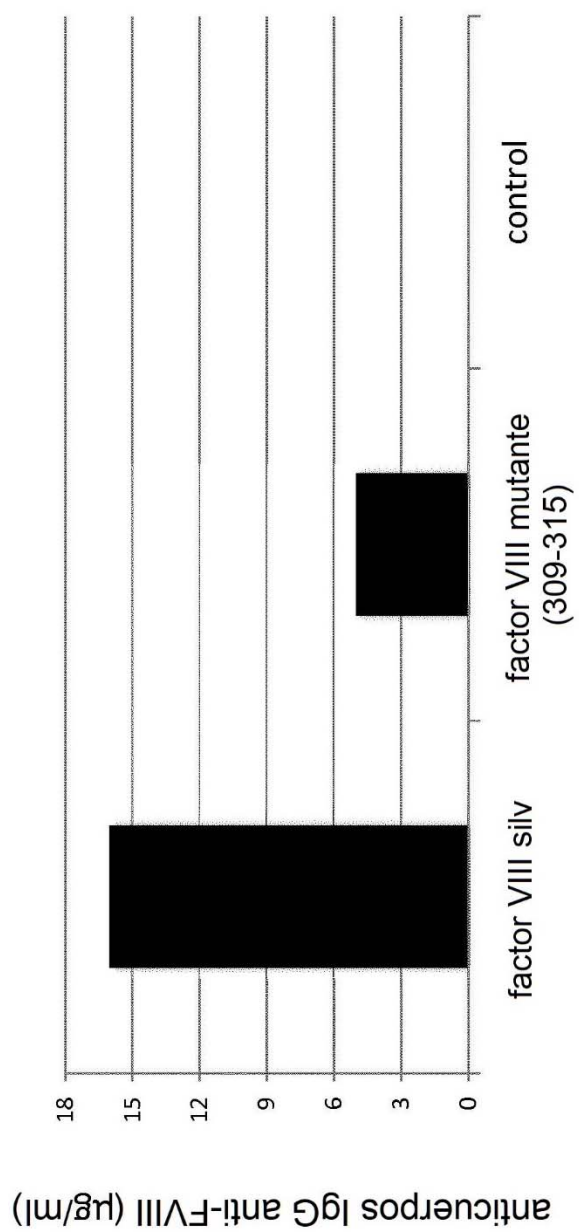


Figura 3b

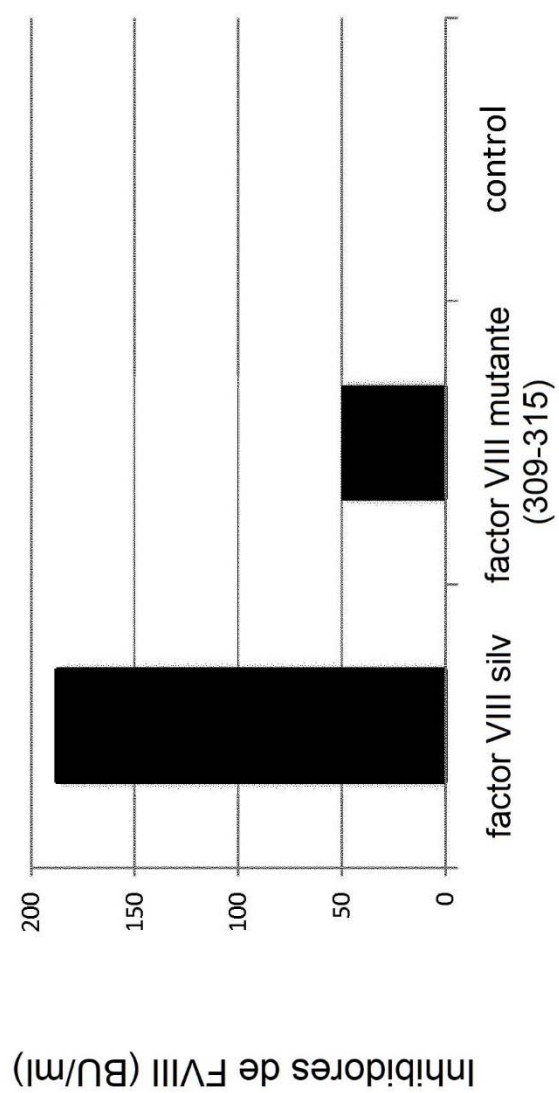


Figura 4

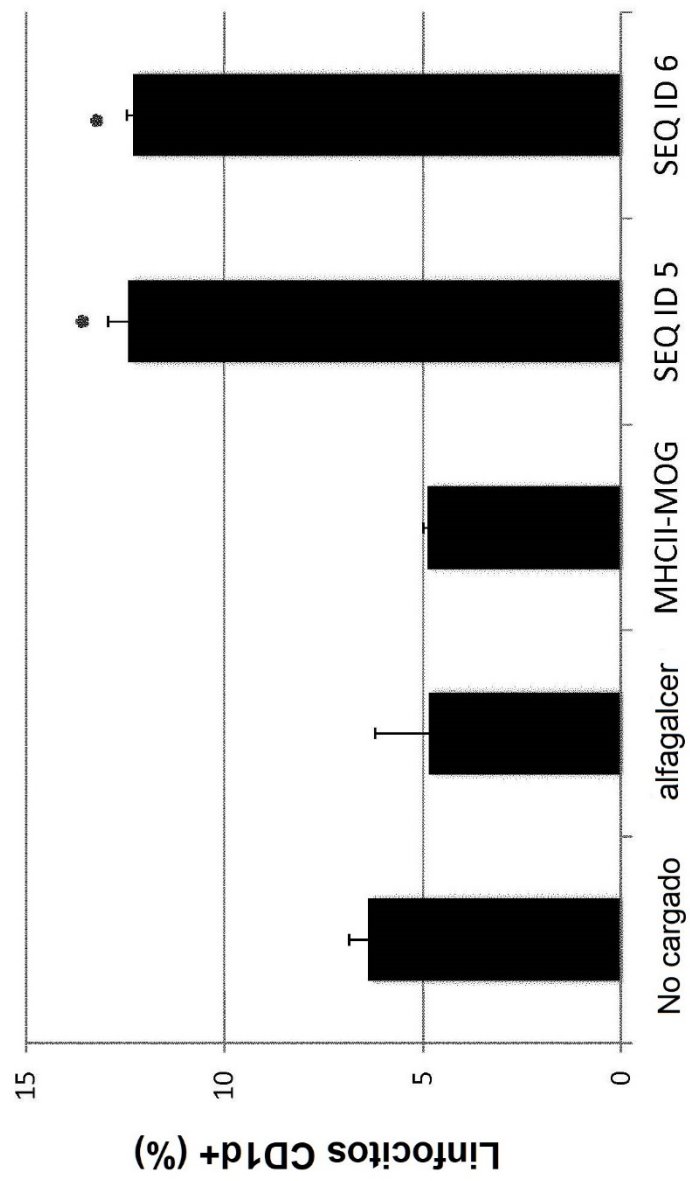


Figura 5

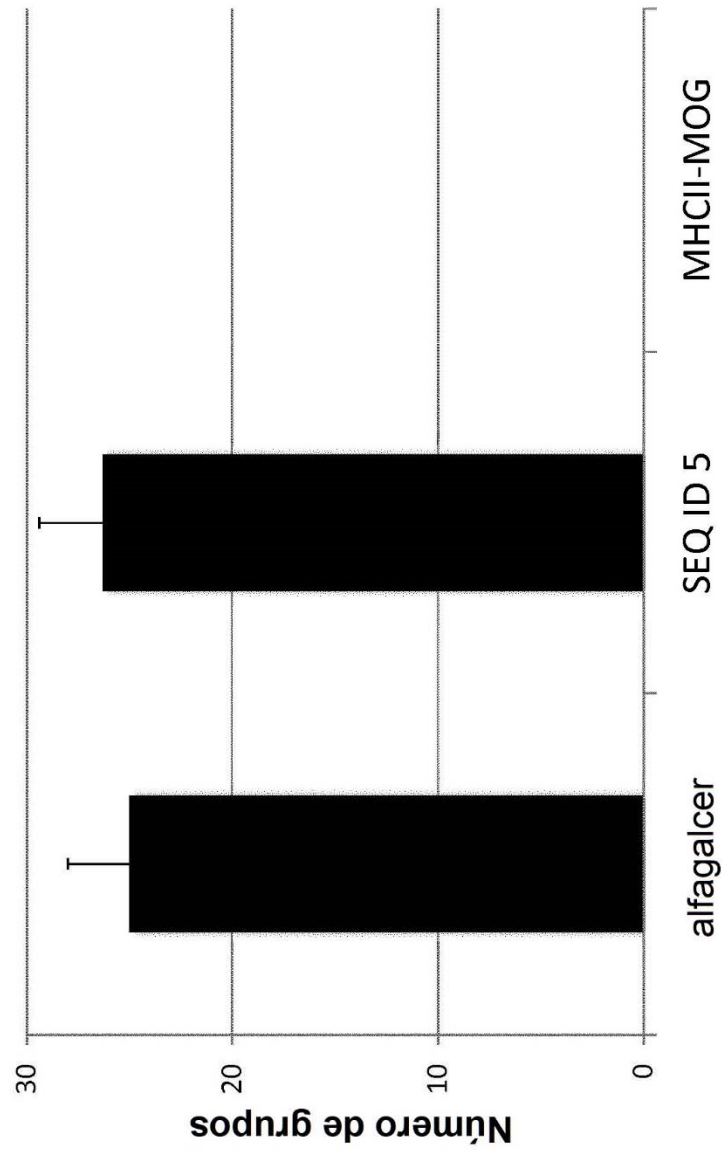


Figura 6

