

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 882**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36	(2006.01)	A61P 7/04	(2006.01)
A61K 38/37	(2006.01)		
A61K 38/47	(2006.01)		
A61K 36/00	(2006.01)		
C12N 5/02	(2006.01)		
C12N 5/00	(2006.01)		
A01H 9/00	(2006.01)		
C07K 14/755	(2006.01)		
C07K 14/28	(2006.01)		
C12N 15/82	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2014 PCT/US2014/065994**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15073988**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2014 E 14862042 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3068869**

54 Título: **Composiciones para la supresión de la formación de inhibidores contra el factor VIII en pacientes con hemofilia A**

30 Prioridad:

15.11.2013 US 201361905069 P
15.11.2013 US 201361905071 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2021

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (50.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US y
UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

HERZOG, ROLAND W. y
DANIELL, HENRY

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 821 882 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

Composiciones para la supresión de la formación de inhibidores contra el factor VIII en pacientes con hemofilia A

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de las plantas recombinantes y al tratamiento de trastornos para los que se desea la inducción de tolerancia oral a antígenos administrados terapéuticamente. Más específicamente, la invención proporciona composiciones y métodos para inducir tolerancia oral al factor VIII y otros factores de coagulación mejorando así los resultados terapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 La hemofilia es el trastorno hemorrágico ligado a X causado por mutaciones en el factor IX de coagulación (FIX, hemofilia B) o su cofactor, factor VIII (FVIII, hemofilia A). Dado que la serina proteasa FIX tiene una actividad muy baja en ausencia de FVIII, las mutaciones en cualquiera de las proteínas pueden causar el defecto de coagulación. Esta enfermedad afecta a 1 de cada 7,500 nacimientos de varones en todo el mundo por hemofilia A y a 1 de cada 30,000 por hemofilia B.¹⁻³ Por consiguiente, la mayoría de los pacientes tienen deficiencia de FVIII. El tratamiento estándar actual se basa en la infusión intravenosa (IV) de concentrado de factor recombinante o derivado de plasma. Una complicación mayor de esta terapia es la formación de anticuerpos inhibidores ("inhibidores"), que ocurre en el 20-30 % de los pacientes con hemofilia A grave (definida por <1 % de actividad de coagulación) y en el ~5 % de los pacientes con hemofilia B grave.^{1,4-6} Los inhibidores complican gravemente el tratamiento y aumentan la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad. Las dosis aumentadas de factor pueden restablecer la hemostasia en pacientes con inhibidores de títulos bajos (<5 Unidades Bethesda, BU), mientras que se requieren factores de derivación para tratar una hemorragia en presencia de inhibidores de títulos altos. Sin embargo, estos tratamientos son costosos y se deben dosificar cuidadosamente. Los protocolos clínicos para la reversión de la respuesta de anticuerpos a través de la inducción de tolerancia inmunitaria (ITI) consisten en la administración frecuente de dosis altas de factor durante períodos prolongados (meses a > 1 año), son muy costosas (> \$ 1,000,000) y -30 % de los pacientes con inhibidores de FVIII no responden.⁴

25 Lei TC et al, Blood. 2005 Jun 15;105(12):4865-70 describe la inducción de tolerancia a inhibidores del factor VIII mediante terapia génica con dominios inmunodominantes A2 y C2 presentados por células B como proteínas de fusión de Ig.

Sumario de la invención

30 De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición que comprende material vegetal liofilizado que comprende al menos un fragmento de FVIII conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), dicho fragmento que consiste en un dominio de FVIII seleccionado del grupo que consiste en C2 y cadena pesada (HC), habiéndose producido dicho fragmento conjugado con CTB en cloroplastos dentro de dicha planta y conservando la inmunogenicidad en forma liofilizada, que tras la administración oral a un mamífero que lo necesite es eficaz para producir tolerancia oral al FVIII.

35 En ciertas realizaciones, la planta se selecciona del grupo que consiste en lechuga, tomate, manzana, bayas tales como fresas y frambuesas, frutas cítricas, plátano, zanahoria, apio, coliflor; brócoli, hojas de berza, pepino, melón, sandía, pimiento, pera, uva, melocotón, rábano y col rizada.

40 También se proporciona de acuerdo con la invención una composición que comprende material vegetal liofilizado que comprende al menos un fragmento de FVIII conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), dicho fragmento consiste en un dominio de FVIII seleccionado del grupo que consiste en C2 y cadena pesada (HC), habiéndose producido dicho fragmento conjugado a CTB en cloroplastos dentro de dicha planta y conservando la inmunogenicidad en forma liofilizada, que tras la administración oral a un mamífero que lo necesita es eficaz para producir tolerancia oral al FVIII, en la que la composición es para uso en un método de tolerancia oral para el tratamiento de la hemofilia A.

45 En determinadas realizaciones, se administran juntos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis dominios. Las composiciones y métodos de ejemplo incluyen aquellos en los que se administran juntas una proteína de fusión C2-CTB y una HC-CTB. Los presentes inventores han descubierto que las composiciones descritas en este documento son eficaces para reducir la formación de inhibidores contra FVIII en sujetos con hemofilia A. De este modo, la invención también proporciona composiciones según la invención para su uso en un método para el tratamiento de la hemofilia A en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración de proteínas de fusión C2-CTB y HC-CTB juntas, siendo dicha composición eficaz para inducir la expresión de células T reguladoras CD4⁺CD25⁻LAP⁺ productoras de TGF-β en el bazo.

Breve descripción de los dibujos

55 Figuras 1A y 1B: vectores de transformación de cloroplasto e integración de transgenes en el genoma del cloroplasto. A. Vectores de expresión de cloroplasto de tabaco. Secuencias flanqueantes del genoma del cloroplasto homólogo

- que comprenden secuencias del gen 16S3, *trnI*, *trnA*; *Prrn*, promotor del operón de ARN ribosómico con un sitio de unión al ribosoma GGAGG; *aadA*, gen de la aminoglucósido 3'-adeniltransferasa para conferir resistencia a espectinomicina; 5' UTR, promotor y 5' UTR del gen *psbA* del tabaco; 3' UTR, 3' UTR del gen *psbA* del tabaco; CTB, subunidad B de la toxina del cólera. En ambos vectores se incluye una bisagra de Gly Pro Gly Pro (GPGP) y un sitio de escisión de furina (RRKR) entre CTB y la secuencia del dominio FVIII. WT, tipo salvaje sin transformar. Nt, *Nicotiana tabacum*. Se indican el sitio de restricción de AflIII y los tamaños de los fragmentos de Southern blot. B. Southern blot, tabaco CTB-HC, WT (sin transformar), líneas 1-3 transplastómicas. El ADN genómico total del tabaco se digirió con AflIII y se analizó con un fragmento de la región flanqueante de *trnI/trnA* de 0.81 kb. C. Southern blot, tabaco CTB-C2, WT (tipo salvaje sin transformar), 1-4 líneas transplastómicas.
- Figuras 2A-2F. Caracterización de la expresión de CTB-HC y CTB-C2 en cloroplastos de tabaco. A. Detección de proteína de fusión de cadena pesada analizada con el anticuerpo CTB. Estándar CTB: 6.25ng, 12.5ng, 25ng. WT: tipo salvaje sin transformar. 1-4, líneas transplastómicas. Se cargaron cinco µg de proteína total de fracción homogeneizada por carril. B. Detección de cadena pesada analizada con el anticuerpo A2. CTB: 25 ng. 1-4, líneas transplastómicas. Se cargaron cinco µg de proteína total de fracción homogeneizada por carril. C. Detección de la proteína de fusión C2 analizada con el anticuerpo CTB. Estándar CTB: 5ng, 10ng, 20ng. S: fracción de sobrenadante; H: fracción de homogeneizado. Se cargaron dos µg de proteína total de sobrenadante o fracción de homogeneizado por carril. D. Cuantificación de la expresión de CTB-HC y CTB-C2 en cloroplastos de tabaco. Las proteínas se extrajeron de las hojas maduras en diferentes puntos de tiempo el mismo día. TLP, proteína total de la hoja. Ensayo de unión ELISA de GM1 de *E. gangliósido*. Estándar CTB (0.1 ng); CTB-HC de tabaco (5 µg); CTB-C2 de tabaco (1 µg); tabaco de tipo salvaje sin transformar (5 µg); BSA, albúmina de suero bovino (5 µg) F. Electroforesis en gel azul nativo y análisis de western blot para evaluar el ensamblaje del pentámero. Tamaños del pentámero: CTB: 57.5 kDa; CTB-C2: 155 kDa; CTB-HC: 490 kDa. Muestras cargadas: estándar CTB, 100 ng; WT, 40 µg; CTB-HC, 40 µg; CTB-C2, 10 µg.
- Figuras 3A - 3F. Supresión de la formación de inhibidores contra FVIII en ratones C57BL6/129 con hemofilia A mediante la administración oral de una mezcla 1:1 de antígenos CTB-C2 y CTB-HC FVIII bioencapsulados. A. Cronograma de administración del antígeno oral y tratamiento intravenoso con BDD-FVIII. El número en círculo indica el punto de tiempo para el sangrado de la cola. B. Títulos de inhibidor (en BU/ml) después de 4 inyecciones i.v. semanalmente de FVIII en animales no alimentados ("sin planta") o ratones alimentados con material vegetal que contenga WT o FVIII. Títulos de IgG1 (C), IgG2a (D), IgG2b (E) contra FVIII para los mismos grupos experimentales. Los datos en B-E se muestran para ratones individuales y como promedios ± SEM. F. Después de la extracción de sangre, se sacrificaron los ratones y se recogieron los bazos. Se estimularon *in vitro* cultivos de esplenocitos para ratones individuales (n=3 a 5 por grupo) con 10 µg/ml de BDD-FVIII durante 48 horas. Posteriormente, las células se recolectaron y se sometieron a análisis cuantitativo de RT-PCR. El "aumento de veces" es un cambio en las transcripciones de ARN de FVIII frente a cultivos estimulados de forma simulada. La línea horizontal punteada indica el aumento mínimo requerido de 2.5 veces para una diferencia estadísticamente significativa. G: Los esplenocitos derivados de los mismos ratones experimentales se sometieron a análisis ELISPOT para determinar la frecuencia de la población de células secretoras de IL-10. Todos los datos se muestran para ratones individuales y como promedios ± SEM. Se usaron pruebas T de Student de dos colas no apareadas para calcular los valores de P (* ** P <0.01).
- Figuras 4A - 4E. Supresión de la formación de inhibidores contra FVIII en ratones BALB/c con hemofilia A mediante la administración oral de una mezcla 1:1 de antígenos CTB-C2 y CTB-HC FVIII bioencapsulados. A: Programa de alimentación y tratamiento con FVIII. El número en círculo indica el punto de tiempo para el sangrado de la cola. B: Títulos de inhibidor (en BU/ml) después de 4 inyecciones i.v. semanalmente de BDD-FVIII en grupos alimentados "Sin planta", "Planta WT" y "Planta FVIII". Títulos de IgG1 (C), IgG2a (D), IgG2b (E) contra FVIII para los mismos grupos experimentales. Todos los datos se muestran para ratones individuales y como promedios ± SEM. Se usaron pruebas T de Student de dos colas no emparejadas para calcular los valores de P (*P<0.05, ** P<0.01).
- Figuras 5A -5F. Control a largo plazo y reversión de la formación de inhibidores en ratones BALB/c con hemofilia A. A: Programa de administración (HC y C2) y de alimentación FVIII para prevenir la formación de inhibidores. Los números en círculos indican el punto de tiempo para la extracción de sangre. Los títulos de inhibidor en BU/ml (B) y los títulos de IgG1 contra FVIII (C) en las semanas 8, 12 y 21 del experimento para ratones alimentados con FVIII (n=5, símbolos del reverso del cuadrado) se comparan con ratones de control (que fueron alimentados con material vegetal WT, n=7, diamantes grises). Se indican diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos para puntos de tiempo específicos (* P <0.05, ** P <0.01, y *** P <0.001, calculado por la prueba T de Student de dos colas no apareado; los datos son promedios ± SEM). Un tercer grupo de ratones (n=7) también se alimentó con material de FVIII, y se administró IV FVIII una vez a la semana comenzando un mes después del inicio del régimen de tolerancia oral. Sin embargo, se continuó con la alimentación y el tratamiento con FVIII durante el resto del experimento (esto es, 20 semanas de alimentación con FVIII; estos ratones están etiquetados como "FVIII alimentados continuamente" y representados en gráficos con símbolos de triángulo negro y línea de puntos en los paneles B y C; los datos son promedios ± SEM). D: Programa de administración y alimentación de FVIII para revertir la formación de inhibidores. La formación de inhibidores se indujo mediante inyecciones IV semanales repetidas de FVIII como se indica. Los ratones se dividieron en 2 grupos con títulos de inhibidor promedio similares. Los ratones de control (n=5) no recibió ningún tratamiento adicional. El segundo grupo ("alimentado con FVIII", n=4) se alimentó con material vegetal de FVIII

dos veces por semana durante los 3 meses siguientes. Títulos de inhibidor en BU/ml (E) y títulos de IgG1 contra FVIII (F) se representan gráficamente para las semanas 5, 9, 13 y 17 de los experimentos explicados anteriormente.

Figuras 6A y 6B. Supresión activa de la formación de anticuerpos contra FVIII por inducción de células T reguladoras. A. Experimentos de transferencia adoptiva. Las células CD4⁺, CD4⁺CD25⁻, y CD4⁺CD25⁺ se purificaron mediante clasificación magnética de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones alimentados con FVIII (n=3) en el punto de tiempo 3 indicado en la figura 5A y se combinaron (con una proporción final de aproximadamente 30 % de bazo y 70 % de células T CD4⁺ derivadas de MLN). Las células (10⁶ por ratón) se transfirieron adoptivamente a ratones BALB/c sin tratamiento previo mediante inyección en la vena de la cola. Las células de control procedían de ratones sin tratamiento previo no desafiados de la misma cepa. Veinticuatro horas más tarde, todos los ratones receptores (n=5 por grupo) fueron expuestos a 1 IU de FVIII en adyuvante mediante inyección subcutánea. Los títulos de IgG contra FVIII se determinaron 3 semanas después. Todos los datos se muestran como promedios ± SEM; * P < 0.05, ** P < 0.01. B. Frecuencias de subconjuntos de Treg en ratones BALB/c con hemofilia A alimentados con FVIII y control. Se aislaron células derivadas de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), ganglios linfáticos inguinales (ILN) y placas de Peyer (PP) de ratones que habían sido alimentados con FVIII (HC+C2, "alimentados con FVIII") o con material vegetal WT ("control") seguido de tratamiento IV con FVIII ("alimentado con FVIII"). Las células teñidas se seleccionaron en primer lugar para detectar células CD4⁺ vivas (tinción con CD4-eFluor 450 positiva y tinción con tinte de viabilidad negativa eFluor 506). Las frecuencias de células CD4⁺CD25-LAP⁺, células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y células Tr1 (CD4⁺LAG-3⁺CD49b⁺) se calcularon usando análisis de citometría de flujo. Se muestran datos para animales individuales así como promedios ± SEM (n=3-5/grupo). Se usaron pruebas T de Student de dos colas no apareadas para calcular los valores de P para todos los paneles.

Figuras 7A-7D. Administración de antígeno de FVIII al GALT y a la circulación. A-C: Inmunotinciones (aumento original 200X) de crío-secciones de íleon de ratones BALB/c con hemofilia A sin alimentar (A, control negativo) o alimentados con CTB-C2 (B: lámina propia, C: parche de Peyer). Las tinciones son para el dominio C2 de FVIII (verde), CDI 1c (rojo) y núcleos (DAPI; azul). D: Se midieron los niveles de antígeno de FVIII humano en plasma o extracto de proteína hepática de ratones con hemofilia A C57BL6/129 y BALB/c alimentados con CTB-HC y ratones de control alimentados con WT de la misma cepa usando ELISA específico para HC. Todos los datos se muestran para ratones individuales y como promedios ± SEM.

Figuras 8A-8C: Respuestas de anticuerpos contra la proteína CTB en ratones con hemofilia A alimentados con material vegetal transgénico de cloroplasto de FVIII. Títulos en suero de IgG1 (A), IgG2a (B) e IgG2b (C) contra CTB después de 8 semanas de tratamiento con una mezcla de material de tabaco transgénico CTB-HC y CTB-C2. Los sueros de ratones de la misma cepa 2 semanas después del desafío con 20 µg de CTB en adyuvante sirvieron como controles positivos. Ratones sin tratamiento previo no desafiados de la misma cepa sirvieron como controles negativos. La línea horizontal punteada indica el fondo del ensayo (lecturas promedio para los controles negativos). Todos los datos se muestran para ratones individuales y como promedios ± SEM.

Figuras 9A-9G: Generación y caracterización de plantas de lechuga transplastómicas CTB-C2 A: Vector de expresión de CTB-C2 de lechuga y una porción del genoma del cloroplasto nativo. 16S trnI y trnA 23S, secuencias flanqueantes del genoma del cloroplasto homólogas de lechuga que comprenden secuencias terminales 16S 3' (o 23 5') y genes trnI, trnA completos; Prmn, promotor del operón de ARN ribosómico con sitio de unión al ribosoma GGAGG; aadA, gen de la aminoglucosido 3'-adeniltransferasa para la resistencia a espectinomicina; 5' UTR, promotor y 5' UTR del gen *psbA* de lechuga; 3' UTR, 3' UTR del gen *psbA* de lechuga; CTB, subunidad B de la toxina del cólera. Se incluye una bisagra de Gly Pro Gly Pro (GPGP) y un sitio de escisión de furina (RRKR) entre CTB y la secuencia C2. WT, tipo salvaje. Se indican el sitio de restricción de AflIII y los tamaños de las bandas positivas de Southern blot. B: Southern blot. WT (tipo salvaje sin transformar), 1-5: líneas transplastómicas, el ADN genómico de la lechuga se digirió con AflIII y se sondaron con la región flanqueante de la lechuga de 1.12 kb. La banda positiva de 7.4 kb contiene el fragmento de inserción CTB-C2 en las líneas transplastómicas. La ausencia del fragmento WT (4.8 kb) en las líneas transplastómicas 1 y 4 demuestra claramente la homoplasma. C: Western blot. Sonda anti-CTB pAb. Estándar CTB: 5ng, 10ng, 20ng. S: fracción de sobrenadante; H: fracción de homogeneizado. Peso molecular de CTB-C2: 31 kDa. CTB: 12 kDa. Se cargaron 2.5 µg de proteína total de sobrenadante o fracción de homogeneizado por carril. D: ensayo de unión ELISA de GM1 de gangliósido. Estándar CTB (0.1 ng); CTB-C2 (1 µg); tipo salvaje de lechuga sin transformar (1 µg); BSA, albúmina de suero bovino (5 µg). E: Niveles de expresión de CTB-C2 (Promedio ± STDEV) en µg/g de hojas frescas y liofilizadas. Materiales de hojas liofilizadas de plantas T0: 2004 ± 136; Fresco: 94 ± 6. F: Comparación de concentraciones de proteínas entre las muestras de hojas liofilizadas y hojas frescas. Para este análisis se usó la misma cantidad de material de hojas liofilizado o fresco. 1, extracto de CTB-C2 sin diluir (60 µg de polvo de hojas); 1:10, dilución 10 veces (6 µg de polvo de hojas); 1:20, dilución 20 veces (3 µg de polvo de hojas). WT, lechuga de tipo salvaje. Estándar CTB: 7.5 ng y 15 ng por carril cargado para cuantificación. G: Preparación de cápsulas: hojas de lechuga liofilizadas y en polvo que expresan la proteína de fusión CTB-C2 para su uso como antígeno oral.

Figuras 10A y 10B. Cribado de plantas de lechuga CTB-HC (TI) (A); por análisis de western blot (B). Sonda: anti-CTB; CTB-HC = 97.7 kDa. Todas las plantas individuales excepto la planta # 14 mostraron expresión de la proteína de fusión CTB-HC.

Figura 11. Cribado de plantas de lechuga CTB-C2 (TI) mediante análisis de Western blot. Todas las plantas individuales mostraron expresión de la proteína de fusión CTB-HC.

Descripción detallada de la invención

La hemofilia A es el trastorno hemorrágico ligado a X debido a la deficiencia del factor de coagulación VIII (FVIII). Para abordar las complicaciones graves de la formación de anticuerpos inhibidores en la terapia de reemplazo actual, creamos líneas transplastómicas de tabaco que expresan antígenos de FVIII, cadena pesada (HC) y C2, fusionadas con el portador transmucoso, subunidad B de la toxina del cólera (CTB). Las proteínas de fusión CTB HC y CTB-C2 se expresan hasta 80 o 370 µg/g en hojas frescas, ensambladas en formas pentaméricas y unidas a receptores GM1. La protección del antígeno del FVIII a través de la bioencapsulación en células vegetales y la administración oral al sistema inmunológico intestinal se confirmó mediante inmunotinción. La alimentación de la mezcla de HC/C2 suprimió sustancialmente las respuestas de las células T auxiliares y la formación de inhibidores contra el FVIII en ratones con hemofilia A de dos antecedentes de cepas diferentes. Se requirió una administración oral prolongada para controlar la formación de inhibidores a largo plazo. La reducción sustancial de los títulos de inhibidores en ratones preinmunes demostró que el protocolo también podría revertir la formación de inhibidores. Los análisis de expresión génica y citometría de flujo mostraron una regulación positiva de las citoquinas inmunosupresoras (TGF-β/LAP e IL-10). Los experimentos de transferencia adoptiva confirmaron un mecanismo de supresión activo y revelaron la inducción de células T CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ que suprimieron de forma potente la formación de anti-FVIII. En resumen, estos datos apoyan la tolerancia oral basada en células vegetales para la supresión de la formación de inhibidores contra el FVIII.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica de la biología molecular. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen en este documento métodos y materiales apropiados.

En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Se hace referencia a libros de texto estándar de biología molecular que contienen definiciones y métodos y medios para llevar a cabo técnicas básicas, abarcadas por la presente invención. Véase, por ejemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1982) y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989); *Methods in Plant Molecular Biology*, Maliga et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1995); *Arabidopsis*, Meyerowitz et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1994) y las diversas referencias allí citadas.

Los métodos, vectores y composiciones para transformar plantas y células vegetales se enseñan, por ejemplo, en los documentos WO 01/72959; WO 03/057834; y WO 04/005467. El documento WO 01/64023 analiza el uso de construcciones de genes libres de marcadores.

Las proteínas expresadas de acuerdo con ciertas realizaciones enseñadas en este documento se pueden usar *in vivo* mediante la administración a un sujeto, humano o animal, de diversas formas. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral o parenteral, esto es, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. De este modo, esta invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de la proteína de fusión (o derivado de la misma) o un cóctel de la misma disuelta en un portador aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Se puede usar una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua regulada, solución salina al 0.4 %, glicerina al 0.3 % y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de partículas. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes reguladores y de ajuste del pH, agentes reguladores de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de proteína de fusión (o porción de la misma) en estas formulaciones puede variar ampliamente dependiendo de la secuencia de aminoácidos específica de las proteínas en cuestión y la actividad biológica deseada, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0.5 %, normalmente al menos aproximadamente 1 % hasta entre un 15 y un 20 % en peso y se seleccionará principalmente en base a los volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante el consumo del producto alimenticio que se ha fabricado con la planta transgénica que produce la proteína terapéutica. La parte comestible de la planta se usa como componente dietético mientras que la proteína terapéutica se administra en el procedimiento.

De este modo, en una realización, la invención se refiere a una composición que induce tolerancia administrable que comprende un factor de tolerancia oral, tal como un factor de coagulación, que ha sido expresado por una planta y un remanente de planta. Un remanente de planta puede incluir una o más moléculas (tales como, pero no se limitan a, proteínas y fragmentos de las mismas, minerales, nucleótidos y fragmentos de las mismas, componentes estructurales de la planta (tales como compartimentos celulares), etc.) derivadas de la planta en la que se expresó el antígeno. De acuerdo con lo anterior, una vacuna perteneciente a material vegetal completo (por ejemplo, todo o porciones de hojas de plantas, tallos, frutos, etc.) o extracto de plantas en bruto ciertamente contendría una alta concentración de restos

de plantas, así como una composición que comprende antígeno purificado que y uno o más restos de plantas detectables.

5 Las composiciones que inducen la tolerancia de ciertas realizaciones de la presente invención pueden formularse con un vehículo o diluyente farmacéutico para administración oral, intravenosa, subcutánea, intranasal, intrabronquial o rectal. La composición farmacéutica se puede formular de manera clásica usando vehículos, diluyentes y aditivos sólidos o líquidos apropiados al modo de administración deseado. Por vía oral, la composición se puede administrar en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos y similares con al menos un vehículo, por ejemplo, almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactasa, gelatina, etc. La preparación también se puede emulsionar. El ingrediente inmunogénico activo a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes apropiados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH o adyuvantes que mejoran la eficacia de las vacunas. La preparación para la administración parental incluye agua esterilizada, suspensión, emulsión y supositorios. Para los agentes emulsionantes, se pueden usar propilenglicol, polietilenglicol, aceite de oliva, etiloleato, etc. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir polialquén glicol, triglicéridos, witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, glicerogelatina, etc. Además, calidad farmacéutica de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares se pueden usar como excipientes.

20 Los factores de tolerancia oral se pueden administrar mediante el consumo del producto alimenticio que ha sido elaborado con la planta transgénica y la parte comestible de la planta que expresa el antígeno se usa directamente como un componente dietético mientras se administra la vacuna en el procedimiento.

25 Ejemplos de plantas fácilmente comestibles que se pueden transformar para expresar las construcciones descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, manzana, bayas tales como fresas y frambuesas, frutas cítricas, tomate, plátano, zanahoria, apio, coliflor; brócoli, hojas de berza, pepino, melón, sandía, pimienta, pera, uva, melocotón, rábano y col rizada.

Las proteínas inductoras de tolerancia se pueden proporcionar con el jugo de las plantas transgénicas para la conveniencia de la administración. Para ello, las plantas que se va a transformar se seleccionan preferentemente entre las plantas comestibles que consiste en tomate, zanahoria y manzana, que se consumen habitualmente en forma de zumo.

30 Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear variantes activas de los genes descritos específicamente en este documento para producir composiciones terapéuticas derivadas de plantas. J Exp Med. 1997 May 19;185(10):1793-801 proporciona algunos ejemplos específicos de fragmentos de proteínas antigénicas conocidas y genes que las codifican.

35 También se describe un genoma de cloroplasto transformado que se ha transformado con un vector que comprende un gen heterólogo que expresa un factor de coagulación. En una realización relacionada, la presente invención se refiere a una planta que comprende al menos una célula transformada para expresar un factor de coagulación.

40 En una realización, los polipéptidos del factor de coagulación según la invención comprenden al menos 12, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 265 aminoácidos contiguos de una secuencia conocida del factor de coagulación. Por lo tanto, un polipéptido de factor de coagulación de la invención puede ser una porción (o fragmento) de un factor de coagulación, una proteína de factor de coagulación de longitud completa, o una proteína de fusión que comprende todo o un porción de la proteína del factor de coagulación. Los expertos en la técnica, equipados con las enseñanzas en este documento, estarán capacitados para expresar y usar otros factores de coagulación conocidos. Los ejemplos de otros factores de coagulación que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas secuencias de polipéptidos asociadas con los siguientes números de acceso NG_009258.1; NG_008953.1; NG_008107.1; NG_008051.1; NM_001993.3 y NM_00128.3, como se proporciona en las bases de datos relacionadas a la fecha de presentación de la presente invención. Además, el apéndice A muestra ejemplos representativos de secuencias relacionadas con factores de coagulación señalados. Se conocen las regiones interactivas y las regiones de proteasa de estas secuencias.

50 Las variantes del polipéptido del factor de coagulación que son biológicamente activas, esto es, que confieren la capacidad de aumentar la tolerancia contra el factor correspondiente tras la administración oral, también se consideran polipéptidos del factor de coagulación para los fines de esta solicitud. Preferiblemente, las variantes polipeptídicas del factor de coagulación de origen natural o no natural tienen secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 55, 60, 65 o 70, preferiblemente aproximadamente 75, 80, 85, 90, 96, 96 o 98 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de la secuencia conocida del factor de coagulación. El porcentaje de identidad entre una variante de polipéptido de factor de coagulación putativo y una secuencia de aminoácidos conocida se puede determinar, por ejemplo, usando el programa de alineación Blast2 (Blosum62, Expect 10, códigos genéticos estándar).

Las variaciones en el porcentaje de identidad pueden deberse, por ejemplo, a sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se definen como sustituciones de uno por un aminoácido. Son de

naturaleza conservadora cuando el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales y/o químicas similares. Ejemplos de reemplazos conservadores son la sustitución de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina.

5 Las inserciones o deleciones de aminoácidos son cambios en una secuencia de aminoácidos o dentro de ella. Por lo general, se encuentran en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. Puede encontrarse orientación para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar sin abolir la actividad biológica o inmunológica de un polipéptido del factor de coagulación usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, tales como el software DNASTAR. Si un cambio de aminoácido da como resultado un polipéptido del factor de coagulación biológicamente activo se puede determinar fácilmente ensayando la actividad del factor de coagulación, como se describe, por ejemplo, en los ejemplos específicos, a continuación.

10 Un polinucleótido del factor de coagulación puede ser monocatenario o bicatenario y comprende una secuencia codificante o el complemento de una secuencia codificante para un polipéptido del factor de coagulación.

15 Los ejemplos de otros polinucleótidos de factores de coagulación que se pueden usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas secuencias de polinucleótidos asociadas con los siguientes números de acceso NG_009258.1; NG_008953.1; NG_008107.1; NG_008051.1; NM_001993.3 y NM_00128.3, como se proporciona en las bases de datos relacionadas a la fecha de presentación de la presente invención.

20 El FVIII es una molécula altamente inmunogénica que puede provocar potentes respuestas de anticuerpos en pacientes con hemofilia A y en animales de experimentación a dosis bajas de antígeno. En algunas circunstancias, se pueden formar autoanticuerpos contra el FVIII en individuos no hemofílicos, lo que resulta en hemofilia A adquirida. La mayoría de los inhibidores se unen al dominio A2, A3 o C2. Estas secuencias altamente inmunogénicas también contienen varios epítopos de células T CD4+. Los estudios en animales sugieren que la formación de inhibidores contra el FVIII se puede prevenir mediante la tolerancia a partes de la molécula, tales como la combinación de dominios A2 y C2, mientras que un solo dominio puede no ser suficiente. En este documento se muestra que la cadena pesada de FVIII y el dominio C2 se pueden expresar como proteínas de fusión de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) en el tabaco. La administración oral de una mezcla de estos antígenos bioencapsulados suprime la formación de inhibidores en ratones con hemofilia A.

30 De acuerdo con lo anterior, en vista de las enseñanzas en este documento, se debe apreciar que se puede usar la secuencia del factor de coagulación de longitud completa o porciones de la misma que conservan los péptidos epítopos. Las porciones pueden incluir fragmentos polipeptídicos de al menos 15 aminoácidos con el objetivo de incluir y preservar el potencial inmunogénico de al menos un epítipo peptídico de la secuencia. Sin embargo, idealmente, la secuencia administrada incluye tantos epítopos como sea posible, ya que esto aumentaría la probabilidad de una tolerización exitosa. Por ejemplo, con respecto a la secuencia de FVIII, la secuencia completa se puede expresar, o porciones de la misma, por lo general como una proteína de fusión con CTB. Van Haren et al., Mol Cell Proteomics, 2011 Jun;10(6): MI 10.002246, enseña varias secuencias pertenecientes a epítopos (véase, por ejemplo, la figura 2B).

35 Otras referencias que enseñan la ubicación de diferentes epítopos de la secuencia de FVIII incluyen Jones et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis 2005, 3:991- 1000; Reding et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003, 1:1777:1784; Pratt et al., Thromb Haemost 2004: 92:522-8; y Hu et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis 2004, 2:1908-1917. El FVIII comprende múltiples dominios: A1, A2, A3, B, C1 y C2. En determinadas realizaciones, la secuencia pertenece a la secuencia completa de al menos uno de los dominios y, opcionalmente, al menos una porción o la totalidad de dos, tres, cuatro, cinco o seis dominios. La siguiente es una secuencia de aminoácidos de FVIII (homo sapiens), que se puede usar en un esquema de expresión de plásmidos (como mediante la implementación de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos completa o porciones de la misma) o composiciones basadas en plásmidos como se enseña en este documento:

40

MQIELSTCFLLCLLRFCSATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELP
 VDARFPFVPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDT
 VVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQV
 L KENGPMA SDPLCLTYSYLSHVLDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLF
 AVFDEGKSWHSETKNLSMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYW
 HV IGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSH
 QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRS
 VAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMA
 Y TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR
 RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGL
 IGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLED
 PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMV
 YEDTLTLFPFSGETVFM MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYED
 SYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWF AHRTPM
 PKIQNVSSSDLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSSEMTHF
 RPQLHHS GDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLA
 AGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNSKLL ESGLM
 NSQESSWGKNVSSTESGR LFKGKRAHG PALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNR
 KTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTT
 SSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDM SFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGSPK
 QLVSLGPEKSV EQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLF LTNLDNLHEN
 NTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTFKNFMKNL FLLSTRQNVEGSYDGA
 YAPVLQDFRSLNDSTNR TTKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNT
 SQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNE
 KEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLP
 AASYRKKDSGVQESSHFLQGAKNNLSLAILTLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKV
 ENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAI
 KWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEK SPEKTA
 FKKKDTILSLNACESNHAI AAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQRE

ITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLW
 DYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVVFQEFQDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRA
 EVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMM
 APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT
 IFDETKSWYFTENMERNCRAPSNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR
 IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWR
 VECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHY
 SGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQ
 TYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMGCDL
 NSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEW
 LQVDFQKTMKVTVGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGN
 Q DSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

5 Secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican polipéptidos del factor de coagulación, así como secuencias de nucleótidos homólogas que son al menos aproximadamente 50, 55, 60, 65, 60, preferiblemente aproximadamente 75, 90, 96 o 98 % idénticas a la secuencia de nucleótidos que codifica un factor de coagulación también son polinucleótidos del factor de coagulación. El porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de dos polinucleótidos se determina usando programas informáticos tales como ALIGN que emplean el algoritmo FASTA, usando una búsqueda de brechas afines con una penalización por apertura de brechas de -12 y una penalización por extensión de brechas de -2. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), los homólogos de especies y las variantes de polinucleótidos del factor de coagulación que codifican polipéptidos del factor de coagulación biológicamente
 10 activos también son polinucleótidos del factor de coagulación.

Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden realizar fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aun así dar como resultado un polipéptido activo.

15 Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de exploración de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan para determinar su actividad para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción sustrato-enzima también se pueden determinar mediante el análisis de la
 20 estructura tridimensional determinada por técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje de fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

TABLA 2: Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	sustituciones conservadoras de ejemplo,
Ala;	ser
Arg;	lys, gln
Asn;	gln, his
Asp;	glu
Cys;	ser
Gln;	asn, lys
Glu;	asp
Gly;	pro
His;	asn, gln
Ile;	leu, val
Leu;	ile, val
Lys;	arg, gln
Met;	leu, ile
Phe;	met, leu, tyr
Ser;	thr
Thr;	ser
Trp;	tyr
Tyr;	trp, phe
Val;	ile, leu

Los cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que las de la tabla 2, esto es, seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo como una hoja o una conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, está sustituido por (o por) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por (o por) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o por) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) aumentando el número de sitios para la sulfatación y/o glicosilación.

Por ejemplo, los expertos en la técnica conocen la sustitución de un residuo de aminoácido por otro que es biológica y/o químicamente similar como sustitución conservadora. Por ejemplo, una sustitución conservadora sería reemplazar un residuo hidrófobo por otro, o un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Tales variaciones conservativamente sustituidas de cada secuencia explícitamente descrita se incluyen dentro de los polipéptidos en mosaico descritos en este documento.

Se puede emplear mutagénesis por sustitución o delección para insertar sitios para N-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glicosilación (Ser o Thr). También pueden ser deseables delecciones de cisteína u otros residuos lábiles. Las delecciones o sustituciones de sitios de proteólisis potenciales, por ejemplo, Arg, se logra, por ejemplo, eliminando uno de los residuos básicos o sustituyéndolo por residuos de glutaminilo o histidilo.

Ciertas derivaciones postraduccionales son el resultado de la acción de las células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados de manera postraducciona a los correspondientes residuos de glutamilo y asparilo. Alternativamente, estos residuos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos o-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación del carboxilo C-terminal.

Dado que esta especificación analiza diversas proteínas y secuencias de proteínas, se entiende que también se describen los ácidos nucleicos que pueden codificar esas secuencias de proteínas. Esto incluiría todas las secuencias degeneradas relacionadas con una secuencia de proteína específica, esto es, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia de proteína en particular, así como todos los ácidos nucleicos, incluidos los ácidos nucleicos degenerados, que codifican las variantes descritas y los derivados de las secuencias de proteína. De este modo, aunque cada secuencia de ácido nucleico en particular no puede escribirse en este documento, es evidente que todas y cada una de las secuencias se describen de hecho y se describen en este documento a través de la secuencia de proteínas descrita.

Las variantes y los homólogos de los polinucleótidos del factor de coagulación descritos anteriormente también son polinucleótidos del factor de coagulación. Por lo general, las secuencias de polinucleótidos del factor de coagulación homólogas se pueden identificar mediante hibridación de polinucleótidos candidatos a polinucleótidos de factores de coagulación conocidos en condiciones estrictas, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, usando las siguientes condiciones de lavado: 2 X SSC (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.03 M, pH 7.0), SDS al 0.1 %, temperatura ambiente dos veces, 30 minutos cada una; luego 2X SSC, SDS al 0.1 %, 50 °C una vez, 30 minutos; luego 2X SSC, temperatura ambiente dos veces, 10 minutos cada una de las secuencias homólogas se pueden identificar que contienen como máximo aproximadamente 25-30 % de apareamientos incorrectos de pares de bases. Más preferiblemente, las cadenas de ácido nucleico homólogas contienen 15-25 % de apareamientos incorrectos de pares de bases, incluso más preferiblemente 5-15 % de apareamientos incorrectos de pares de bases.

Los homólogos de especies de los polinucleótidos del factor de coagulación descritos en este documento también se pueden identificar haciendo sondas o cebadores apropiados y cribando bibliotecas de expresión de ADNc. Es bien sabido que la T_m de un ADN bicatenario disminuye entre 1-1.5 °C con cada disminución del 1 % en la homología (Bonner et al., J. Mol. Biol. 81, 123 (1973)). Las variantes de polinucleótidos del factor de coagulación o polinucleótidos de otras especies, por lo tanto, se pueden identificar hibridando un polinucleótido de factor de coagulación homólogo putativo con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o el complemento de la misma para formar un híbrido de prueba. La temperatura de fusión del híbrido de prueba se compara con la temperatura de fusión de un híbrido que comprende polinucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos perfectamente complementarias y se calcula el número o porcentaje de apareamientos incorrectos de pares de bases dentro del híbrido de prueba.

Las secuencias de nucleótidos que hibridan con polinucleótidos del factor de coagulación o sus complementos después de condiciones rigurosas de hibridación y/o lavado también son polinucleótidos del factor de coagulación. Las condiciones de lavado rigurosas son bien conocidas y comprendidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., 1989, en las páginas 9.50-9.51.

Por lo general, para condiciones de hibridación rigurosas, se debe elegir una combinación de temperatura y concentración de sal que sea aproximadamente 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio. La T_m de un híbrido entre un polinucleótido de factor de coagulación que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o el complemento de la misma y una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente 50, preferiblemente aproximadamente 75, 90, 96 o 98 % idéntica a una de esas secuencias de nucleótidos se pueden calcular, por ejemplo, usando la ecuación de Bolton and McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5 \text{ }^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\% \text{ de formamida}) - 600/I$$

donde I = la longitud del híbrido en pares de bases.

Las condiciones de lavado más estrictas incluyen, por ejemplo, 4 X SSC a 65 °C, o formamida al 50 %, 4 X SSC a 42 °C, o 0.5 X SSC, SDS al 0.1 % a 65 °C. Las condiciones de lavado muy estrictas incluyen, por ejemplo, 0.2X SSC a 65 °C.

También se describe un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad genética propensa y con riesgo de experimentar una reacción anafiláctica en respuesta a la terapia de reemplazo de proteínas. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un factor de tolerancia y un remanente de planta, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína correspondiente a un defecto o deficiencia asociado con dicha enfermedad. Por lo general, un factor de tolerancia se refiere a un factor de coagulación (véase arriba), una α -glucosidasa ácida (números de acceso NM_001079803.1, NM_001079804.1, NM_0001152.3), α -galactosidasa A, (número de acceso NM_000169.2) Glucocerebrosidasa (números de acceso 103059, 103060), α -L-iduronidasa (número de acceso NM_000203.3) o esfingomielinasa (números de acceso NM_000543.3, NM_001007593.1). Los principios descritos anteriormente con respecto a los polipéptidos y polinucleótidos del factor de coagulación y variantes en los once párrafos anteriores también se aplican a las secuencias asociadas con los números de acceso provistos en este párrafo. Además, la enfermedad tratada por lo general se refiere a Hemofilia A, Hemofilia B, enfermedad de Pompe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, mucopolisacaridosis I o enfermedad de Niemann-Pick. Los factores de tolerancia se pueden conjugar con una proteína CTB (véase, por ejemplo, Lai, CY, Journal of Biological Chemistry, (1977) 252:7249-7256, o el número de acceso DQ523223, también véase ref 39) para mejorar el potencial de tolerancia oral.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas realizaciones de la invención. No pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplo I

Si bien actualmente no existen protocolos profilácticos contra la formación de inhibidores en pacientes, los experimentos preclínicos en modelos murinos de hemofilia A han proporcionado una prueba de principio de que se puede establecer una tolerancia inmunitaria preventiva al FVIII.⁶⁻¹¹ Sin embargo, tales protocolos usan manipulación genética o fármacos inmunosupresores, lo que plantea problemas de seguridad para la traducción al tratamiento humano. Por el contrario, la tolerancia oral podría ser una forma más aceptable de inducción de tolerancia profiláctica

y puede ser probada más fácilmente en ensayos clínicos.^{12,13} Sin embargo, la entrega tolerogénica eficaz del antígeno del factor de coagulación al tejido linfoide asociado al intestino (GALT) es un desafío.¹⁴ Se ha desarrollado un sistema rentable para la producción de altos niveles de proteína en cloroplastos de células vegetales transplastómicas, que proporcionan bioencapsulación del antígeno a través de las paredes celulares que contienen celulosa.^{15,16} Debido a la gran cantidad de genomas de cloroplasto por célula y a nuestro sistema de expresión optimizado, las proteínas transgénicas se pueden acumular en las hojas verdes a niveles mucho más altos que en el caso de tecnologías de plantas transgénicas más tradicionales.^{17,18} La administración oral de células vegetales transplastómicas ha sido eficaz en la prevención de la insulinitis en ratones diabéticos no obesos y de la formación de inhibidores en ratones con hemofilia B.^{19,20}

Para los inhibidores de FIX, la ITI a menudo no es sostenible debido a reacciones anafilácticas y al desarrollo del síndrome nefrótico. En ratones con hemofilia B, se demuestra que la administración oral repetida de FIX bioencapsulado previno la formación de inhibidores y la anafilaxia fatal en la terapia de reemplazo posterior.²⁰ Alentados por estos resultados, buscamos desarrollar un protocolo para la hemofilia A. El FVIII es una proteína grande, compuesta de una señal péptido y un polipéptido de 2332 aminoácidos. Estructuralmente, el FVIII contiene 6 dominios distintos, que están organizados en el siguiente orden: A1 -A2-B-A3-C1-C2.²¹ El dominio B central grande está altamente glicosilado y ayuda en la secreción de la molécula.²²⁻²⁴ Sin embargo, el FVIII con el dominio B recombinante eliminado (BDD) es biológicamente activo y representa uno de los productos que se usan actualmente en la clínica. El FVIII se secreta como un heterodímero después de al menos dos escisiones intracelulares dentro del dominio B. Por consiguiente, el FVIII circulante está compuesto por una cadena pesada (que contiene dominios A1-A2-B) y una cadena ligera (dominios A3-C1-C2), que están unidas de forma no covalente.^{21, 23.}

El FVIII es una molécula altamente inmunogénica que puede causar potentes respuestas de anticuerpos en pacientes con hemofilia A y en animales de experimentación a dosis bajas de antígeno.^{6, 25} La mayoría de los inhibidores se unen al dominio A2, A3 o C2.^{6, 26-28} Estas secuencias altamente inmunogénicas. Las secuencias también contienen varios epítotos de células T CD4+:^{6,29,30} Los estudios en animales sugieren que la formación de inhibidores contra el FVIII se puede prevenir mediante la tolerancia a partes de la molécula, tales como la combinación de dominios A2 y C2, mientras que un solo dominio puede no ser suficiente.^{14,31} Aquí, se demuestra que la cadena pesada de FVIII y el dominio C2 se pueden expresar como proteínas de fusión de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) en los cloroplastos de tabaco. La administración oral de una mezcla de estos antígenos bioencapsulados suprimió y también invirtió la formación de inhibidores en un modelo de ratón de hemofilia A.

Los siguientes materiales y métodos se proporcionan para facilitar la práctica de la presente invención.

Diseño y construcción de vectores de expresión de cloroplasto

Debido a que se requiere el suministro eficiente de antígeno bioencapsulado al GALT para la inducción de tolerancia y es facilitado por portadores transmucosos, los antígenos humanos del FVIII se expresaron como fusiones de CTB, una estrategia exitosa para el suministro tolerogénico de FIX y proinsulina.^{20, 32} Debido al gran tamaño de la molécula de FVIII y la necesidad de que las fusiones CTB formen pentámeros para unirse al receptor GM1 en las células epiteliales intestinales, se construyeron dos vectores de transformación de cloroplasto de FVIII separados para incluir ya sea la cadena pesada (abreviado como HC, con secuencia de aminoácidos idéntica a la del BDD-FVIII recombinante y, por lo tanto, que contiene dominios A1 y A2 y 5 aminoácidos del dominio B) o el dominio C2. El fragmento de ADN de FVIII-HC humano se amplificó mediante PCR. Los productos de PCR, flanqueados por una escisión de furina y sitios de restricción apropiados, se clonaron en el vector pCR BluntII Topo (Invitrogen) y se verificó la secuencia. A continuación, el fragmento de ADN de HC se ligó con el vector de transformación de cloroplasto pLD-Ctv-5CP que contenía las secuencias de bisagra de CTB y GPGP para crear el vector de expresión de pLD-CTB-HC.^{19,33} También se construyó un vector de expresión pLD-CTB-C2 análogo. Los vectores de cloroplasto pLD-CTB-HC y pLD-CTB-C2 (Figura 1A) contienen secuencias flanqueantes homólogas *16S/trnI* y *trnA/23S* del genoma del cloroplasto de tabaco para facilitar la recombinación con el genoma del cloroplasto nativo. La expresión de CTB-HC y CTB-C2 está regulada por el promotor *psbA* 5'UTR de cloroplasto de tabaco altamente expresado y 3'UTR. Los casetes de expresión de CTB-HC y CTB-C2 contienen una bisagra de glicina-prolina-glicina-prolina (GPGP) entre CTB y el elemento HC o C2 para evitar el impedimento estérico de las proteínas de fusión. Además, se creó un sitio de escisión de furina, Arg-Arg-Lys-Arg, en la región de unión de las proteínas de fusión para liberar eficazmente los dominios del FVIII después de la internalización por las células epiteliales.³⁴

Los casetes de expresión incluyen el gen marcador de selección *aadA* (aminoglucósido 3' adenililtransferasa) con un sitio de unión al ribosoma GGAG, impulsado por un promotor del operón ribosómico del plástido del tabaco (*Prrn*), para conferir resistencia a espectinomicina. Los vectores de transformación de cloroplasto finales pLD-CTB-HC y pLD-CTB-C2 (Figura 1A) se secuenciaron y usaron para la transformación.³³ Regeneración de plantas de tabaco transplastómicas

Los vectores de transformación de cloroplasto de tabaco pLD-CTB-HC y pLD-CTB-C2 (Figura 1A) se usaron para transformar tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante bombardeo de partículas con partículas de oro recubiertas con el ADN del plásmido.³³ Las hojas bombardeadas se transfirieron luego a medio de selección/regeneración. La regeneración de plantas de tabaco transplastómicas de FVIII se realizó como se describió anteriormente.^{33,34,35}

Caracterización de la expresión de FVIII en tejidos foliares de plantas transplásticas

El análisis de inmunotransferencia y la cuantificación de las proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2 se realizaron mediante protocolos previamente informados.^{18,34} El ensayo de unión al receptor de gangliósido GM1 se realizó como se informó anteriormente.³⁴ La electroforesis en gel nativo de gradiente Bis-Tris 3-12 % seguida de análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo siguiendo el manual de instrucciones del NativePage Novex Bis-Tris Gel System (Life Technologies).

El fragmento de ADNc de la cadena pesada del FVIII humano (dominios A1-A2 más los primeros 5 aminoácidos del dominio B) se amplifica mediante PCR. Los productos de PCR, flanqueados por una escisión de furina y sitios de restricción apropiados, se clonan en el vector pCR BluntII Topo (Invitrogen) y se verifica la secuencia. El vector de expresión de lechuga pLsDV-CTB.C2 que contiene el fragmento de CTB-C2 se amplificó a partir de pLD-CTB.C2 mediante PCR, y la secuencia del producto de PCR se confirmó después de la clonación en el vector pCR BluntII Topo. El vector de expresión de lechuga pLs-CTB.C2 se creó subclonando el casete Ls 5' UTR/CTB-C2/Ls 3' UTR en el vector pLsDV.^{34,35} La regeneración de las plantas de lechuga se realizó como se describió anteriormente.^{33,35}

Caracterización de la planta de lechuga transplástica F.VIII

Para evaluar la integración transgénica y la homoplasma de las líneas transplásticas, se llevaron a cabo análisis de PCR y Southern blot. El análisis de inmunotransferencia y la cuantificación de las proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2 se realizaron mediante protocolos informados previamente. El ensayo de unión al receptor de gangliósido GM1 se realizó como se informó anteriormente. La electroforesis en gel nativo en gradiente Bis-Tris 3-12 % seguida de análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo siguiendo el manual de instrucciones del NativePage Novex Bis-Tris Gel System (Life Technologies).

Liofilización y almacenamiento

Las hojas de lechuga que expresan CTB-C2 se liofilizaron en Freezone Benchtop Freeze Dry Systems (Labconco) como se describió anteriormente.³⁶ Las hojas liofilizadas se almacenaron a temperatura ambiente al vacío durante algunas semanas y se molieron hasta obtener un polvo fino en un mezclador Warring. El polvo fino de lechuga liofilizada se almacenó seco a temperatura ambiente durante varios meses.

Experimentos y cepas de ratón

Ratones macho con hemofilia A con delección dirigida del exón 16 de *F8* (*F8e16^{-/-}*) en una mezcla de C57BL6/129 o en un fondo puro de BALB/c se alojaron en condiciones especiales libres de patógenos y tenían ~ 2 meses de edad al inicio de los experimentos.^{9,36} El material de las hojas se trituró en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Se suspendió una mezcla de material CTB-HC y CTB-C2 (un total de 125 mg por ratón por dosis) en PBS estéril (200 µl/dosis), se homogeneizó y se administró mediante una aguja de sonda gástrica con punta de bulbo de 20 G. Para el desafío con antígenos, se administró a los ratones 1 IU de BBD-FVIII humano (Xyntha, Pfizer, Nueva York, NY) en la vena de la cola una vez a la semana. Las muestras de plasma se obtuvieron por sangrado de la cola según lo publicado.³⁷ ELISA para antígeno de FVIII y anti-FVIII, los ensayos de Bethesda y los ensayos de linfocitos fueron los publicados.^{9,36,37} Caracterización y cuantificación de las proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2

Se recolectaron hojas de tabaco de plantas maduras en diferentes puntos de tiempo (10 am, 2 pm y 6 pm) el mismo día.^{1,2} En resumen, las muestras de hojas se congelaron y se trituraron en nitrógeno líquido. El polvo de hojas molidas se suspendió en una solución reguladora de extracción (Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, DTT 100 mM, SDS al 0.1 %, sacarosa 400 mM, Tween 20 al 0.05 %, PMSF 2 mM y cóctel inhibidor de proteinasa). La suspensión de hojas (esto es, homogeneizado) se usó directamente para Western blot o se sometió a una centrifugación adicional para separar la porción sobrenadante. El ensayo de Bradford se realizó usando reactivo de colorante de ensayo de proteínas (Bio-Rad) para determinar la concentración de proteína de la proteína total de la hoja en la fracción de homogeneizado y la concentración de proteína de la proteína soluble total en la porción sobrenadante. Para detectar el nivel de expresión de la proteína de fusión tanto en la fracción de homogeneizado como en la porción de sobrenadante, se realizó un análisis de Western blot con anticuerpo anti-CTB como sonda usando una concentración conocida de proteína CTB purificada (Sigma) como estándar. Luego, la concentración de proteína de fusión CTB-HC o CTB-C2 se midió cuantitativamente mediante análisis densitométrico usando Alpha imager 2000. El porcentaje de proteína de fusión y la cantidad de proteína transgénica (µg/g o mg/g) se calcula de acuerdo con la fórmula publicada anteriormente.³

Ensayos de linfocitos

Se aislaron esplenocitos murinos por métodos estándar y se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía β-mercaptoetanol 5 µM, insulina 100 mM/transferrina/selenio, glutamina y penicilina/estreptomicina con o sin 10 µg/ml de FVIII durante 48 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. A continuación, se recogieron las células y se extrajo el ARN usando el kit de aislamiento Qiagen RNeasy (Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La RT-PCR cuantitativa se realizó como se describió anteriormente usando el kit SABiosciences.⁴ Las frecuencias de las células secretoras de IL-10 en ratones C57BL6/129 con hemofilia A en cada grupo se determinaron mediante el ensayo

ELISpot (R&D System, Minneapolis, MN, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. Las manchas se contaron usando el analizador UV CTL-ImmunoSpotH S5 (Cellular Technology, Shaker Heights, OH, EE. UU.). Cada muestra se realizó por duplicado. Se purificaron células CD4⁻, CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺ de bazo y MLN usando un kit de aislamiento magnético (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). A continuación, las células se combinaron para cada grupo experimental y se transfirieron adoptivamente a ratones BALB/c sin tratamiento previo a 10⁶ células por ratón mediante inyección en la vena de la cola. Los ratones receptores fueron desafiados 24 horas después mediante una inyección subcutánea de 1 IU de FVIII en adyuvante (Sigma Adjuvant System, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.).

Ensayos de anticuerpos y antígenos

Las respuestas de anticuerpos al FVIII se midieron mediante ELISA para anti-FVIII IgG1, IgG2a e IgG2b, y mediante el ensayo Bethesda para la formación de inhibidores como se describió anteriormente.⁴⁻⁶ Se detectó el antígeno HC del FVIII humano en circulación mediante ELISA. Los ratones se alimentaron con CTB-HC (250 mg) dos veces al día durante 2 días, y se desangraron y sacrificaron 5 horas después de la última alimentación por sonda. El hígado recolectado se lavó con PBS frío y se homogeneizó en solución reguladora RIPA (PBS con Nonidet P-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0.5 % y SDS al 0.1 %, pH 7.5) con una mezcla completa de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE. UU.) durante 30 min en hielo. Después de centrifugación durante 20 min a 14,000 x g a 4 °C, se recogió el sobrenadante. Para el ELISA específico de HC, la placa se recubrió con 2 µg/ml de GMA-012 (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT, EE.UU.) durante la noche. Se usó BBD-FVIII (Xyntha, Pfizer, Nueva York, NY, EE. UU.) como estándar. Se diluyó FVIII antihumano de oveja (Haematologic Technologies Inc, Essex Junction, VT, EE. UU.) a 0.3 µg/ml y se usó IgG anti oveja de conejo HRP (Invitrogen, Camarillo, CA, EE. UU.) a una dilución 1: 2000. Las respuestas de anticuerpos a CTB se midieron mediante ELISA tal como se publicó.⁷

Citometría de flujo

Se recolectaron bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, placas de Peyer y ganglios linfáticos inguinales, y se prepararon suspensiones de células individuales usando un filtro de células de 70 nm en solución reguladora PBS fría, seguido de bloqueador de Fe durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se tiñeron en la superficie para CD4-eFluor 450, CD25-PE, LAP-Perp a 4 °C, durante 30 min en PBS, seguido de tinción con tinte de viabilidad eFluor 506 a 4 °C, durante 30 min en PBS. La fijación y la tinción de Foxp3 Alexa Fluor 647 se realizaron usando el conjunto de soluciones reguladoras de tinción del factor transcripcional. Otras células se tiñeron en la superficie con CD4-eFluor 450, CD49b-APC y LAG3-PE (tinción Tr1) a 4 °C, durante 30 min en PBS, seguido de tinte de viabilidad eFluor 506. Los controles incluyeron control de isotipo, células positivas simples y no teñidas. Todos los kits y anticuerpos se adquirieron de eBiosciences (San Diego, CA). La citometría de flujo se realizó en un sistema LSR II (BD Bioscience, San José, CA) y los datos se analizaron con el software FCSEXPRESS (De Novo Software, Los Ángeles, CA).

Inmunohistoquímica

Los ratones se alimentaron con CTB-C2 (250 mg) dos veces al día durante 2 días y se sacrificaron 5 horas después de la última sonda. El tejido se recogió, se congeló, se crio-seccionó y se tiñó como se describe.¹⁹ Se usaron los siguientes anticuerpos: cadena ligera anti-FVIII de conejo (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX); biotina antiratón CD11c (1:200, BD Biosciences, San José, CA); IgG anticonejo de burro Alexa Fluor-488 (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) y estreptavidina Alexa Fluor-568 (1:400, Invitrogen, Grand Island, NY). Las imágenes se capturaron usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i, una cámara digital Retiga 2000R (Qimaing, Surrey, BC, Canadá) y el software Nikon Elements.

Resultados

Caracterización de líneas transplastómicas de FVIII

Las supuestas líneas de tabaco transplastómicas obtenidas después del bombardeo de vectores de cloroplasto se cribaron primero mediante análisis de PCR. La integración del transgén específico del sitio en el genoma del cloroplasto se confirmó con dos conjuntos de cebadores específicos 3P/3M y 5P/2M, que se hibridan específicamente con secuencias complementarias del casete del transgén y el genoma del cloroplasto.³³

Tres líneas de tabaco independientes de la transformación pLD-CTB- HC y cuatro las líneas independientes de la transformación pLD-CTB-C2 mostraron productos de PCR positivos de tamaños correctos (datos no mostrados). Las líneas de tabaco transplastómicas CTB-HC- y CTB-C2 se examinaron adicionalmente mediante análisis de Southern blot para determinar la integración estable específica del sitio y la homoplasma. La homoplasma se logra cuando todas las copias de los genomas del cloroplasto tienen transgenes integrados de manera estable. Los resultados mostraron que las 3 líneas probadas de líneas transplastómicas CTB-HC tenían transgenes integrados en sitios específicos y eran homoplásmicas, mostrando solo el fragmento de genoma más grande (8.6 kb) con el inserto del transgén en comparación con el fragmento de 4.4 kb en el genoma de control sin transformar. (Figura 1B). Las líneas de tabaco transplastómicas CTB-C2 también mostraron integración de transgenes en el genoma y homoplasma del cloroplasto (Figura 1C).

La expresión de las proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2 en extractos de proteínas de hojas de plantas de tabaco transplastómicas se evaluó mediante análisis de Western blot. En condiciones completamente desnaturalizadas y reductoras, las transferencias con sonda con anticuerpo policlonal anti-CTB revelaron proteína de fusión CTB HC de longitud completa con la masa molecular esperada de 98 kDa (Figura 2A) en todas las líneas transplastómicas. No se observaron productos escindidos incluso después de la solubilización de pentámeros y la desestabilización de enlaces disulfuro con agentes reductores. Se observó un patrón de bandas similar en una transferencia paralela analizada con un anticuerpo monoclonal específico del dominio anti-A2. Además, no hubo reactividad cruzada de la proteína estándar CTB o cualquier otra proteína vegetal en extractos de hojas sin transformar (ambos usados como controles negativos) con el anticuerpo anti-A2 (Figura 2B). La cuantificación de la proteína de fusión se realizó mediante densitometría en western blots de extractos de hojas usando cantidades conocidas de proteína CTB purificada como estándar. Se encontró que la proteína de fusión CTB-HC acumulaba hasta un 0.8 % de proteína foliar total u 80 µg/g de tejido foliar fresco (Figura 2A y D). La proteína de fusión CTB C2 se analizó de manera similar con anticuerpo policlonal anti-CTB en plantas de tabaco. Como se muestra en la figura 2C, se detectó un polipéptido de 31 kDa que representa el tamaño correcto de la proteína de fusión CTB-C2 en ambas fracciones (sobrenadante y homogeneizado) de líneas transplastómicas independientes. La proteína de fusión CTB-C2 se acumuló hasta un 4.2 % en el homogeneizado (esto es, 4.2 % de TLP o 370 µg por g de hoja fresca, Figura 2D).

Ensamblaje de pentámeros de CTB-HC y CTB-C2 en cloroplastos transgénicos

Un receptor de la membrana plasmática (gangliósido GM1) se une a CTB *in vivo* y se requiere una estructura pentamérica para unirse al receptor GM1.^{38,40} Para evaluar la capacidad de unión al receptor de las proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2 producidas en los cloroplastos del tabaco, se realizó un ELISA de unión a GM1. Como se observa en la figura 2E, los extractos de proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2 junto con la proteína CTB purificada mostraron una fuerte afinidad de unión a GM1. Por lo tanto, las proteínas de fusión CTB-HC y CTB-C2 se ensamblaron correctamente para formar estructuras pentaméricas dentro de los cloroplastos transformados. Para evaluar más a fondo el ensamblaje del pentámero directamente, se analizaron geles nativos azules y las transferencias se sondaron con anticuerpo policlonal anti-CTB. Estos resultados indican que la estructura pentamérica (CTB-HC, 490 kDa; CTB-C2, 155 kDa) se formó en los cloroplastos de tabaco transformados con CTB-HC y CTB-C2. Además, también se observaron otras formas oligoméricas más grandes que los pentámeros (Figura 2F). La falta de productos escindidos confirmó la estabilidad de pentámeros o multímeros ensamblados dentro de los cloroplastos transformados.

La administración oral de FVIII bioencapsulado suprime la formación de inhibidores en ratones hemofílicos

Los materiales de las hojas de las plantas se trituraron en nitrógeno líquido como se publicó.¹⁹ Los materiales CTB-HC y CTB-C2 se mezclaron y suspendieron en solución reguladora PBS de modo que el producto final contenía cantidades aproximadamente iguales de ambas proteínas de fusión (~ 5 µg HC/6 µg C2 por dosis/ratón). Los ratones macho con hemofilia A (F8e16^{-/-}) con antecedentes genéticos C57BL6/129 recibieron alimentación por sonda oral de 125 mg de material mixto por dosis, dos veces por semana durante 2 meses (Figura 3A). Durante el segundo mes, se administró IV concentrado de FVIII (BDD-FVIII recombinante) una vez por semana a 1 IU/ratón. Como se esperaba en base a hallazgos anteriores, los ratones de control que no recibieron alimentación por sonda (n=9) o fueron alimentados con material vegetal WT (n=6) formaron inhibidores de títulos muy altos (50-391 BU/ml; Figura 3B).^{9,36} Estos eran predominantemente IgG1 con sustancialmente menos formación de IgG2a e IgG2b (Figura 3C-E). Por el contrario, la formación de inhibidores se suprimió significativamente (en promedio 7 veces) en aquellos ratones que habían sido alimentados con material vegetal de FVIII (n=6). Estas diferencias en BU se correlacionaron con el nivel de supresión de la formación de IgG1 específica de FVIII (Figura 3C). IgG2a e IgG2b anti-FVIII se volvieron indetectables en ratones alimentados con FVIII (Figura 3D-E).

Para abordar el efecto de la administración oral de antígenos en las respuestas de las células T al FVIII, se recolectaron esplenocitos de ratones C57BL6/129 F8e16^{-/-} que habían sido alimentados con material vegetal que expresaba WT o FVIII y tratados con FVIII. La reestimulación *in vitro* con FVIII indujo la expresión de varias citoquinas asociadas con diferentes respuestas de células T auxiliares en cultivos de ratones alimentados con WT (Figura 3F). IL-6 fue la citoquina expresada más alta y consistentemente, que previamente hemos demostrado que es expresada por células T CD4⁺ de esta cepa en respuesta al FVIII.² Estos ratones de control carecían de expresión de citoquinas inmunosupresoras o marcadores Treg. Por el contrario, los esplenocitos de alimentados con FVIII no mostraron expresión de IL-6 u otras citoquinas asociadas con respuestas de Th1 (IL-2, IFN-γ), Th2 (IL-4, IL-13) o Th17 (IL-17). En cambio, se observó una regulación positiva de los marcadores Treg (CD25, FoxP3, CTLA-4) y, de manera más marcada, de las citoquinas supresoras IL-10 y TGF-β. Por consiguiente, la respuesta se cambió de un efector a una respuesta supresora/regulada. Estos resultados fueron apoyados además por un aumento en los esplenocitos productores de IL-10 en el ensayo ELISpot (Figura 3G)

La supresión de la formación de inhibidores tiene éxito en diferentes antecedentes de cepas

Se realizó un experimento idéntico en ratones con hemofilia A con la misma mutación F8 pero retrocruzados sobre un fondo BALB/c. La formación de inhibidores en esta cepa no es muy rápida.^{36,41} No obstante, los ratones de control (n=8-11/grupo) formaron invariablemente inhibidores de títulos altos (8-200 BU/ml) después de 4 inyecciones IV semanales de FVIII (Figura 4A -B). La respuesta estuvo nuevamente dominada por IgG1, aunque también se observaron respuestas de IgG2a e IgG2b a títulos sustanciales en algunos de los animales (Figura 4C-E). Entre los

ratones alimentados con FVIII, 7 tenían inhibidores indetectables y 4 formaron inhibidores de títulos bajos (1-4 BU/ml), lo que indica una supresión más completa en esta cepa mediante la administración oral de antígeno (Figura 4B). La formación de IgG total se suprimió en aproximadamente 1 log, con la ausencia de IgG2a e IgG2b e IgG1 reducidas a títulos bajos (Figura 4C-E). A continuación, se amplió la administración IV semanalmente de FVIII (sin alimentación adicional) durante otro mes en 5 animales previamente alimentados con material vegetal de FVIII (3 de los cuales tenían inhibidores inicialmente indetectables). Los 5 ratones mostraron un aumento en los títulos de Bethesda a 35-138 BU/ml después de 1 mes (Figura 5B). Como se esperaba, los títulos de IgG de inhibidor y anti-FVIII aumentaron aún más en los animales de control tratados con FVIII en paralelo, alcanzando niveles sustancialmente más altos (en promedio 9 veces) que los de los ratones alimentados inicialmente con FVIII (445-998 BU/ml, Figura 5B). Los ratones de control se alimentaron posteriormente con material vegetal WT durante 2 meses sin exposición adicional al FVIII (Figura 5A). Estos animales mantuvieron sus títulos de Bethesda y mostraron una disminución moderada de IgG1 anti-FVIII (Figura 5B-C). En animales inicialmente tolerizados al FVIII, la administración oral adicional de material vegetal de FVIII durante 2 meses más invirtió los títulos de inhibidor a un promedio de 11 BU/ml, desde indetectable hasta 20 BU/ml, lo que se correlacionó con una reversión de la formación de IgG1 (Figura 5A-C). Un grupo experimental adicional (n=7) se toleró por vía oral, seguido de nuevo por inyecciones IV semanales de FVIII comenzando 1 mes después del inicio de la tolerancia oral. Sin embargo, en este caso, el régimen de tolerancia oral se continuó junto con la terapia de reemplazo (grupo de "FVIII alimentado continuamente" en la figura 5B, C), lo que resultó en una mayor supresión del título promedio de inhibidor en el punto de tiempo # 2, (1.7 veces en comparación con los ratones con administración oral interrumpida y 15 veces en comparación con los ratones de control), y la supresión se mantuvo de nuevo (Figura 5B). Con reminiscencias de nuestros datos publicados sobre FIX, los anticuerpos de unión contra FVIII siguieron siendo detectables mediante ELISA en este grupo (Figura 5C).²⁰

Reversión de la formación de inhibidores

Para probar si el protocolo oral es eficaz en ratones preinmunes, se trataron ratones BALB/c con hemofilia A con FVIII y los dividimos en dos grupos (n=4-5) con títulos Bethesda promedio similares (~ 60 BU). Un grupo (control) no se expuso más al antígeno de FVIII, mientras que el otro grupo se sometió al régimen de tolerancia oral (Figura 5D). Los títulos de inhibidor en los animales de control aumentaron espontáneamente más hasta un promedio de casi 150 BU y finalmente se contrajeron hasta el título original de ~ 60 BU (Figura 5E). Los títulos de IgG1 anti-FVIII mostraron un aumento adicional sustancial hasta un nivel que se mantuvo posteriormente (Figura 5F). En contraste, la administración oral de FVIII ralentizó y luego invirtió la formación del inhibidor, lo que resultó en una disminución de 3 a 7 veces en comparación con los controles después de 2-3 meses de alimentación (Figura 5E). La formación de IgG1 también se redujo significativamente (~ 2.5 veces, Figura 5F).

La administración oral de antígenos induce una respuesta Treg contra el FVIII

Los ensayos de linfocitos en la cepa C57BL6/129 sugirieron la inducción de Treg. Se intentó obtener pruebas más directas de la inducción de la inmunosupresión activa mediante el uso de estudios de transferencia adoptiva, lo que fue posible en el contexto BALB/c puro. Se aislaron linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones BALB/c hemofílicos alimentados con FVIII al final del experimento descrito en la figura 5A. Tras la transferencia adoptiva a ratones sin tratamiento previo de la misma cepa, las células T CD4⁺CD25⁺, y aún más las células T CD4⁺CD25⁻ (pero no las células CD4⁻) pudieron suprimir significativamente la formación de anticuerpos contra el FVIII (Figura 6A). A partir de estudios anteriores, ha quedado claro que CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg son fundamentales en la inducción de tolerancia a los factores de coagulación.^{8,42} Para identificar las células supresoras potenciales en la población de células T CD4⁺CD25⁻, se realizaron análisis de citometría de flujo de diversos tejidos linfáticos en ratones tolerizados frente a ratones de control (Figura 6B). Se encontró una inducción significativa de células T CD4⁺CD25⁻LAP⁺ (que expresan altos niveles de TGF-β) en bazo, MLN y placas de Peyer, pero no inducción de células T reguladoras tipo 1 (Tr1) (que expresan altos niveles de IL-10 y son LAG-3+ CD49b⁺).^{12,13,43} De acuerdo con los datos de la matriz de RT-PCR *in vitro* y nuestros hallazgos anteriores, las frecuencias generales de CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg mostró solo un aumento sutil ya que las células específicas de antígeno de este subconjunto funcionan con números de células bajos.^{42,44}

Administración local y sistémica de FVIII bioencapsulado

La administración de antígeno de FVIII al GALT se demostró mediante inmunotinción, lo que mostró la presencia de antígeno de FVIII alimentado en células epiteliales y el suministro a células dendríticas (DC) en la lámina propia y las placas de Peyer del intestino delgado (Figura 7A-C). La presencia de un sitio de escisión de furina entre las secuencias de CTB y FVIII debería facilitar la administración sistémica del antígeno del FVIII después de la captación en el intestino. De hecho, se encontró antígeno HC en muestras de plasma y extractos de proteína hepática de muestras obtenidas de ratones con hemofilia A 5 horas después de la última alimentación por sonda (Figura 7D). La administración de CTB-HC/CTB-C2 sólo provocó con poca frecuencia respuestas de anticuerpos sistémicos a CTB, y no hubo correlación entre los títulos de inhibidor de anti-CTB y FVIII (Figura 8 y datos no mostrados). El motivo de la formación de anti-CTB en un subconjunto de ratones C57BL6/129 no está claro, pero puede estar relacionado con el procesamiento del antígeno CTB unido al receptor (que se escinde de las secuencias de FVII) o la fuerza de los epítopos de células B o T para esta combinación de antígeno/cepa.

Para facilitar los estudios clínicos traduccionales, los antígenos se deben desarrollar en un cultivo comestible. Por lo tanto, primero se generaron plantas transplastómicas de lechuga (*Lactuca sativa*) CTB-C2. El vector de expresión de cloroplasto de lechuga pLs-CTB.C2 se creó introduciendo las secuencias flanqueantes de lechuga *16S/trnI* y *trnA/23S*, y 5' UTR y promotor del gen *psbA* de la lechuga (Figura 9A). Las plantas transplastómicas se obtuvieron después de 3-4 meses de selección y regeneración después del bombardeo de hojas de lechuga. El análisis de Southern blot indicó que se logró la homoplasma en la mayoría de las líneas transplastómicas (Figura 9B). Se expresó hasta 1.7 % de TLP (o 102 µg/g de hojas frescas) de proteína de fusión CTB-C2 en cloroplastos de lechuga como se observó en el análisis Western blot (Figura 9C). La forma de pentámero de CTB-C2 elaborado con lechuga también se verificó mediante el ensayo de unión a GM1 y mediante análisis de electroforesis en gel nativo azul/ inmunotransferencia (Figura 9D-E). No se observaron productos escindidos incluso después de la disolución de los pentámeros y la desestabilización de los enlaces disulfuro por agentes reductores (Figura 9C). La concentración de antígeno C2 por gramo de tejido foliar aumentó 20 veces después de la liofilización. Se observaron hasta 2004 µg de proteína CTB-C2 por gramo de materiales de la hoja liofilizados (Figura 9F-G) en comparación con 102 µg/g en hojas frescas, que se detectó con un ensayo de inmunotransferencia en paralelo. El polvo de CTB-C2 de lechuga liofilizada y molida se puede preparar como cápsulas (o en una formulación diferente más apropiada para pacientes pediátricos) y almacenarse a temperatura ambiente durante períodos prolongados para facilitar la administración oral en estudios clínicos (Figura 9H).

Para aumentar la biomasa de los materiales de la hoja de CTB-HC, se trasplantaron más de 200 plantas de T1 de la transplastómica de CTB-HC a suelos en el invernadero. Primero se realizó el análisis de Western blot para cribar las plantas positivas (Figura 10). Se recolectaron hojas de lechuga con un alto nivel de expresión de proteína de fusión CTB-HC. Se han recogido más de 10 kg de hojas frescas de lechuga CTB-HC. Se obtuvieron aproximadamente 200 g (peso seco) de polvos de hojas de lechuga CTB-HC liofilizados a partir de 4 kg de hojas frescas de CTB-HC. La concentración de proteína CTB-HC en los polvos de hojas liofilizados fue de 101 µg por g de peso seco.

De la misma forma (Figura 11), se han recolectado aproximadamente 5 kg de hojas frescas de lechuga CTB-C2. Se han obtenido un total de 150 g de materiales de la hoja de CTB-C2 liofilizados a partir de 3 kg de hojas frescas. La concentración de CTB-C2 en los materiales de la hoja liofilizados fue de 3,32 mg por g de peso seco.

Ventajas de la plataforma a base de plantas para la tolerancia oral en la hemofilia

Un protocolo de tolerancia oral sería ideal para la inducción de tolerancia a antígenos específicos mientras se evita el uso de manipulación genética de células del paciente o de fármacos inmunosupresores, que tienen efectos secundarios no deseados, aumentan el riesgo de infección y pueden afectar el desarrollo del sistema inmunológico.^{12,14,16,20} Por lo tanto, la administración oral de antígeno de FVIII puede ser una forma aceptable de inducción de tolerancia profiláctica en pacientes pediátricos. Este estudio actual demuestra que múltiples dominios de FVIII se pueden expresar en cloroplastos de plantas. Además, la administración oral de una mezcla de antígenos de dominio HC y C2 bioencapsulados suprimió sustancialmente la formación de inhibidores en la terapia de reemplazo posterior o en animales con respuesta preexistente a la infusión de FVIII.

La administración oral de proteínas farmacéuticas de origen vegetal está emergiendo como un enfoque eficaz. La bioencapsulación de proteínas terapéuticas dentro de las células vegetales las protege del ambiente hostil del tracto gastrointestinal.^{15,45,46} Además, la eliminación de las altamente costosas purificaciones, almacenamiento en frío, transporte e inyecciones estériles reduce significativamente sus costos. Aunque no hemos optimizado los codones para la expresión de FVIII en la investigación actual, se ha informado que la expresión de proteínas puede alcanzar hasta el 70 % de la proteína total de la hoja, en condiciones óptimas.¹⁸

De este modo, las construcciones descritas en este documento se pueden construir usando las versiones humanizadas de FVIII, aumentando así aún más la eficacia. La ingeniería multigénica es especialmente relevante para los estudios con FVIII porque todos los dominios se pueden expresar simultáneamente en un solo casete de transformación.⁴⁷

Implicaciones clínicas

Se proporciona una prueba de principio para la supresión de inhibidores de FVIII mediante la administración oral de material vegetal transplastómico. La optimización del codón transgénico se puede emplear para aumentar la expresión, como se observa para varios otros genes humanos en los cloroplastos.^{18,32} El dominio C2 se expresa 3.6 veces más alto que la cadena pesada debido a una mayor compatibilidad de codones, lo que subraya la necesidad de optimizar los codones para lograr niveles más altos de expresión en cloroplastos. Usando una combinación de dominios del FVIII, su proporción se vuelve importante. Por ejemplo, observamos solo una reducción de 3 veces en los títulos de inhibidor en ratones C57BL6/129 hemofílicos cuando se usó una proporción de HC-C2 de 1:3 (en lugar de 1:1) (datos no mostrados). La mezcla de antígenos tolerogénicos se puede optimizar aún más preparando diferentes proporciones de dominios o subunidades o mediante la adición de más dominios tales como A3. Los nuevos datos con FVIII demuestran que el enfoque también se puede aplicar para revertir los inhibidores preexistentes que se han formado durante la terapia de reemplazo. De este modo, se han desarrollado nuevos protocolos de tolerancia oral para la prevención de la formación de inhibidores en pacientes de alto riesgo y como una alternativa o una adición a la ITI actual

Inducción de respuestas de células T CD4⁺ supresoras

Los estudios de transferencia adoptiva demuestran que la administración oral de FVIII induce múltiples subconjuntos de células T CD4⁺ que suprimen activamente la formación de anticuerpos. Por lo tanto, este mecanismo es distinto de la tolerancia inmune inducida por el antígeno derivado de hepatocitos, que induce principalmente CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Treg.^{44,48,49} El antígeno presentado en el GALT indujo adicionalmente una respuesta de células T CD4⁺CD25⁻ fuertemente supresora. No se cree que esto refleje la actividad de las células T efectoras de memoria, ya que la transferencia de tales células experimentadas con FVIII de ratones que no habían recibido administración oral aumenta en lugar de suprimir la formación de anti-FVIII (X Wang, observaciones no publicadas). Más bien, los análisis de citometría de flujo de las células T CD4⁺ sugieren la inducción de CD4⁺ CD25⁻LAP⁺ Treg, que se sabe que son inducibles por la presentación de antígenos en el intestino y se suprimen mediante la expresión de grandes cantidades de TGF-β, una citoquina que también es necesaria para la inducción periférica de CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Treg. De acuerdo con la administración de antígeno oral tologénico, se observó inducción de CD4⁺CD25⁻LAP⁺ en las placas de Peyer y MLN, que drenan el intestino, pero no los ganglios linfáticos que no drenan. El aumento de la frecuencia en el bazo es consistente con la supresión de una respuesta sistémica, que se requiere para controlar la formación de inhibidores contra el antígeno de FVIII administrado IV. No se encontró evidencia de inducción de células Tr1. No obstante, hubo inducción de IL-10, una citoquina antiinflamatoria crítica en el GALT. Tanto FoxP3⁺ Treg como LAP⁺ Treg son fuentes potenciales de expresión de IL-10. La coadministración del dominio HC y C2 fue suficiente para suprimir la formación del inhibidor contra la molécula de FVIII completa en la cepa BALB/c. En los seres humanos, es probable que existan epítomos de células T adicionales en otros dominios. Sin embargo, la inducción eficaz de Treg puede proporcionar una supresión suficiente de modo que no todos los epítomos tengan que estar cubiertos por los antígenos administrados por vía oral.

En conclusión, los dominios de FVIII se pueden producir a niveles elevados en hojas de plantas transplásticas. La administración oral de células vegetales modificadas induce Treg que suprime la formación de anticuerpos contra el FVIII administrado IV y, por lo tanto, representa un enfoque prometedor para controlar la formación de inhibidores.

25 Referencias

1. Bemtorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *Lancet*. 2012;379(9824):1447-1456.
2. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005;6(6):488-501.
3. Jayandharan GR, Srivastava A. Hemophilia: Disease, Diagnosis and Treatment. *J Genet Syndr Gene Ther* 2011;S1005.
4. DiMichele DM. Immune tolerance in haemophilia: the longjourney to the fork in the road. *Br J Haematol*. 2012;159(2):123-134.
5. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet*. 1992;339(8793):594-598.
- 35 6. Scott DW, Pratt KP, Miao CH. Progress toward inducing immunologic tolerance to factor VIII. *Blood*. 2013;121(22):4449-4456.
7. Adair P, Su Y, Scott DW. Tolerance induction in hemophilia A animal models: battling inhibitors with antigen-specific immunotherapies. *Discov Med*. 2013;15(84):275-282.
- 40 8. Miao CH. Immunomodulation for inhibitors in hemophilia A: the important role of Treg cells. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):469-483.
9. Moghimi B, Sack BK, Nayak S, Markusic DM, Mah CS, Herzog RW. Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. *J Thromb Haemost*. 2011;9(8):1524-1533.
10. Oliveira VG, Agua-Doce A, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ, Graca L. Adjuvant facilitates tolerance induction to factor VIII in hemophilic mice through a Foxp3-independent mechanism that relies on IL-10. *Blood*. 2013;121(19):3936-3945, S3931.
- 45 11. Sabatino DE, Nichols TC, Merricks E, Bellinger DA, Herzog RW, Monahan PE. Animal models of hemophilia. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;105:151-209.
12. Wang X, Sherman A, Liao G, et al. Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(6):759-773.
- 50 13. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2011;241(1):241-259.
14. Rawle FE, Pratt KP, Labelle A, Weiner HL, Hough C, Lillicrap D. Induction of partial immune tolerance to factor VIII through prior mucosal exposure to the factor VIII C2 domain. *J Thromb Haemost*. 2006;4(10):2172-2179.

15. Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* 2009;14(12):669-679.
16. Kwon KC, Yerma D, Singh ND, Herzog R, Daniell H. Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(6):782-799.
- 5 17. Clarke JL, Daniell H. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol Biol.* 2011;76(3-5):211-220.
18. Ruhlman T, Yerma D, Samson N, Daniell H. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant Physiol.* 2010;152(4):2088-2104.
- 10 19. Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts--oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J.* 2007;5(4):495-510.
20. Yerma D, Moghimi B, LoDuca PA, et al. Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(15):7101-7106.
21. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII. *Nature.* 1984;312(5992):337-342.
- 15 22. Damer AJ, Bole DG, Kaufman RJ. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol.* 1987;105(6 Pt 1):2665-2674.
23. Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia.* 2009;15(6):1187-1196.
24. Roberts SA, Dong B, Firman JA, Moore AR, Sang N, Xiao W. Engineering factor VIII for hemophilia gene therapy. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2011;13(1):S1006.
- 20 25. Wroblewska A, Reipert BM, Pratt KP, Voorberg J. Dangerous liaisons: how the immune system deals with factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):47-55.
26. Markovitz RC, Healey JF, Parker ET, Meeks SL, Lollar P. The diversity of the immune response to the A2 domain of human factor VIII. *Blood.* 2013;121(14):2785-2795.
- 25 27. Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. Antihuman factor VIII C2 domain antibodies in hemophilia A mice recognize a functionally complex continuous spectrum of epitopes dominated by inhibitors of factor VIII activation. *Blood.* 2007;110(13):4234-4242.
28. Pratt KP. Inhibitory antibodies in hemophilia A. *Curr Opin Hematol.* 2012;19(5):399-405.
29. Pratt KP, Thompson AR. B-cell and T-cell epitopes in anti-factor VIII immune responses. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;37(2):80-95.
- 30 30. Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, et al. CD4+ T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic EI 7 HLA-DRB1*1501 mice. *Blood.* 2012;119(17):4073-4082.
31. Lei TC, Scott DW. Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood.* 2005;105(12):4865-4870.
- 35 32. Boyhan D, Daniell H. Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnol J.* 2011;9(5):585-598.
33. Yerma D, Samson NP, Koya V, Daniell H. A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat Protoc.* 2008;3(4):739-758.
- 40 34. Kwon KC, Nityanandam R, New JS, Daniell H. Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC6 cells. *Plant Biotechnol J.* 2013;11(1):77-86.
35. Lakshmi PS, Yerma D, Yang X, Lloyd B, Daniell H. Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation in vitro. *PLoS One.* 2013;8(1):e54708.
- 45 36. Sack BK, Merchant S, Markusic DM, et al. Transient B cell depletion or improved transgene expression by codon optimization promote tolerance to factor VIII in gene therapy. *PLoS One.* 2012;7(5):e37671.
37. Cao O, Loduca PA, Hoffman BE, et al. Impact of the underlying mutation and the route of vector administration on immune responses to factor IX in gene therapy for hemophilia B. *Mol Ther.* 2009;17(10):1733-1742.

38. Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol.* 2001;311(5):1001-1009.
39. de Haan L, Verweij WR, Feil IK, et al. Role of GMI binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology.* 1998;94(3):424-430.
- 5 40. Tsuji T, Watanabe K, Miyama A. Monomer of the B subunit of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* has little ability to bind to GMI ganglioside compared to its coligenoid. *Microbiol Immunol.* 1995;39(10):817-819.
41. Qadura M, Waters B, Bumett E, et al. Immunoglobulin isotypes and functional anti-FVIII antibodies in response to FVIII treatment in Balb/c and C57BL/6 haemophilia A mice. *Haemophilia.* 2011;17(2):288-295.
- 10 42. Markusic DM, Hoffman BE, Perrin GQ, et al. Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies. *EMBO Mol Med.* 2013;5(11):1698-1709.
43. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013;19(6):739-746.
- 15 44. Hoffinan BE, Martino AT, Sack BK, et al. Nonredundant roles of IL-10 and TGF-beta in suppression of immune responses to hepatic AAV-factor IX gene transfer. *Mol Ther.* 2011;19(7):1263-1272.
45. Kohli N, Westerveld DR, Ayache AC, et al. Oral delivery of bioencapsulated proteins across blood-brain and blood-retinal barriers. *Mol Ther.* 2014;22(3):535-546.
46. Limaye A, Koya V, Samsam M, Daniell H. Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB J.* 2006;20(7):959-961.
- 20 47. Kumar S, Hahn FM, Baidoo E, et al. Remodeling the isoprenoid pathway in tobacco by expressing the cytoplasmic mevalonate pathway in chloroplasts. *Metab Eng.* 2012;14(1):19-28.
48. Cao O, Dobrzynski E, Wang L, et al. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood.* 2007;110(4):1132-1140.
- 25 49. Cao O, Armstrong E, Schlachterman A, et al. Immune deviation by mucosal antigen administration suppresses gene-transfer-induced inhibitor formation to factor IX. *Blood.* 2006;108(2):480-486.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende material vegetal liofilizado que comprende al menos un fragmento de FVIII conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), dicho fragmento consiste en un dominio de FVIII seleccionado del grupo que consiste en C2 y cadena pesada (HC), dicho fragmento conjugado a la CTB se ha producido en cloroplastos dentro de dicha planta y conserva la inmunogenicidad en forma liofilizada, que tras la administración oral a un mamífero que lo necesita es eficaz para producir tolerancia oral al FVIII.
2. La composición de la reivindicación 1, para su uso en un método de tolerancia oral para el tratamiento de la hemofilia A.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en lechuga, tomate, manzana, bayas tales como fresas y frambuesas, frutos cítricos, plátano, zanahoria, apio, coliflor; brócoli, hojas de berza, pepino, melón, sandía, pimiento, pera, uva, melocotón, rábano y col rizada.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que hay un péptido bisagra, GPGP, y un sitio de escisión de furina, RRKR, entre dicha CTB y dicho al menos un fragmento de FVIII.
- 15 5. La composición para su uso en un método de tolerancia oral para el tratamiento de la hemofilia A según la reivindicación 2, en la que dicho método comprende administrar proteínas de fusión C2-CTB y HC-CTB juntas, siendo dicha composición eficaz para inducir la expresión de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺LAP⁺ productoras de TGF- β en el bazo.
- 20 6. La composición para su uso en un método de tolerancia oral para el tratamiento de la hemofilia A según la reivindicación 2, en el que dicha tolerancia oral está causada por la supresión de la formación de inhibidores o reversión de inhibidores preexistentes formados durante la terapia de reemplazo de FVIII.

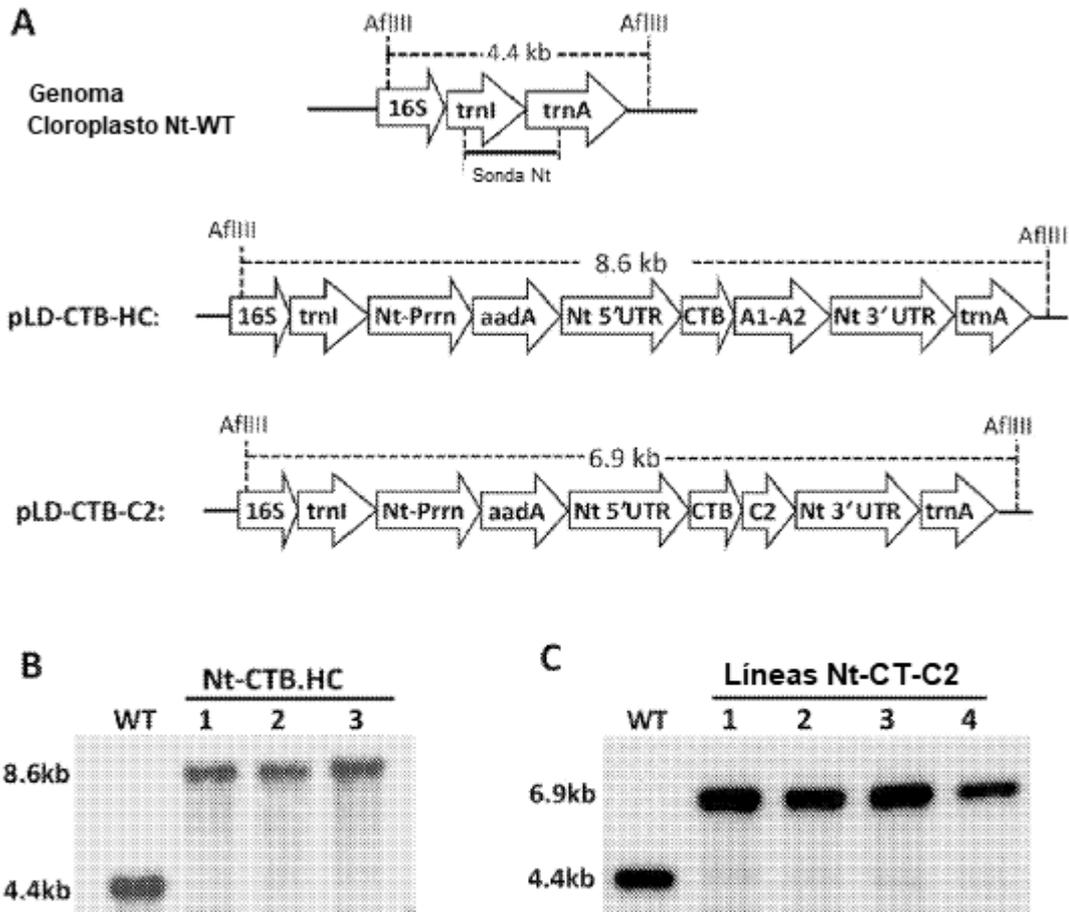


Figura 1

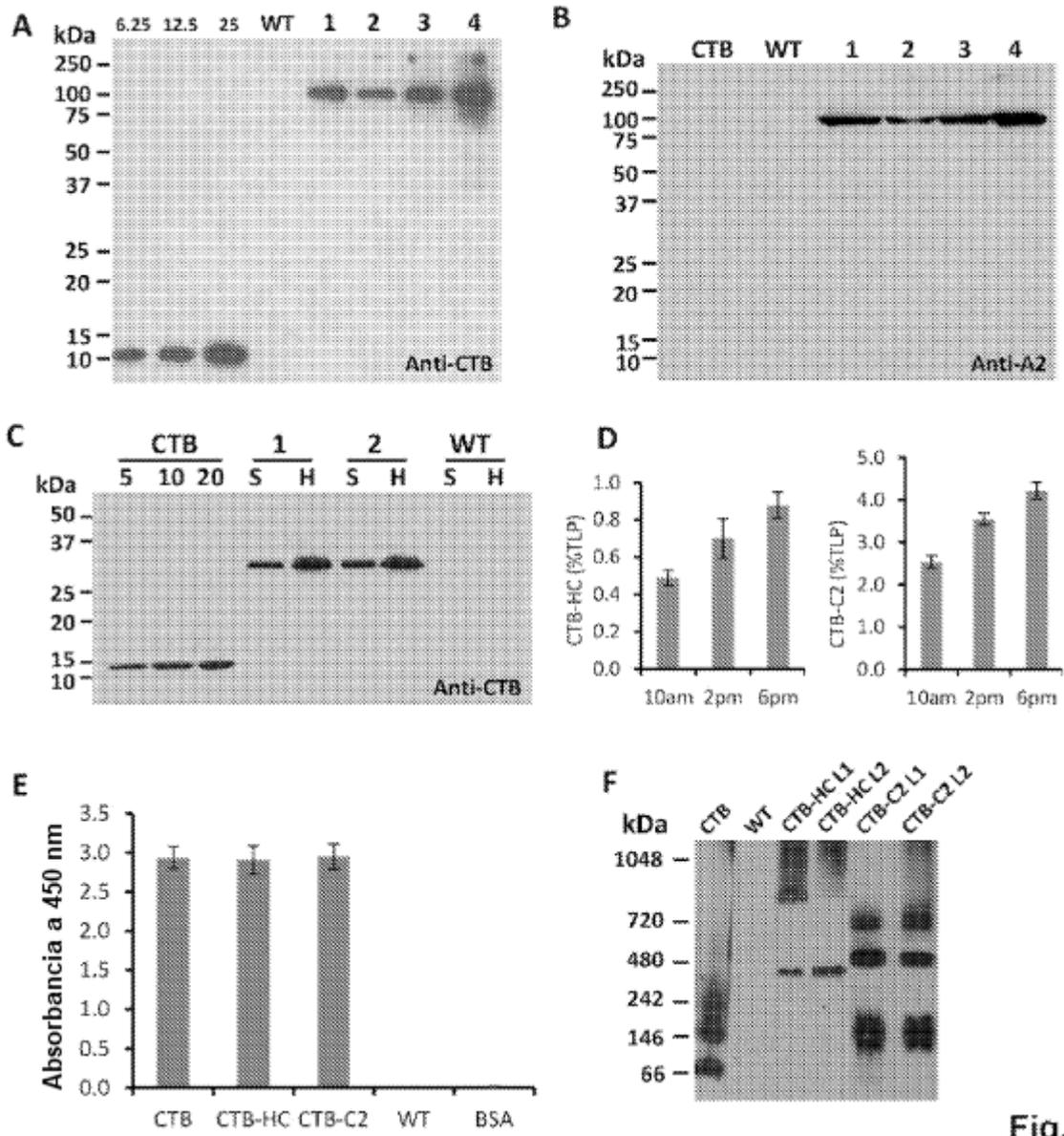


Fig. 2

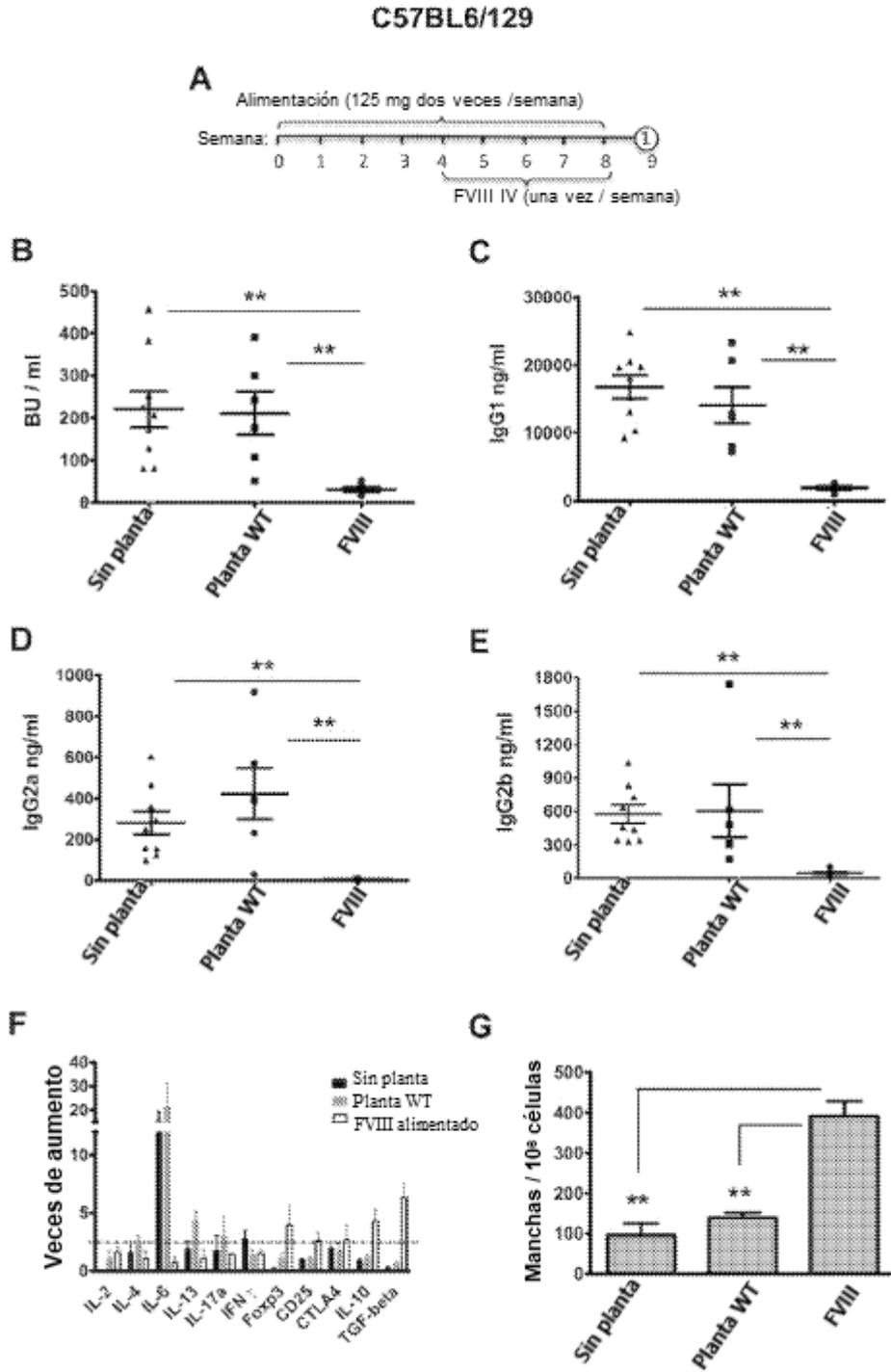


Figura 3

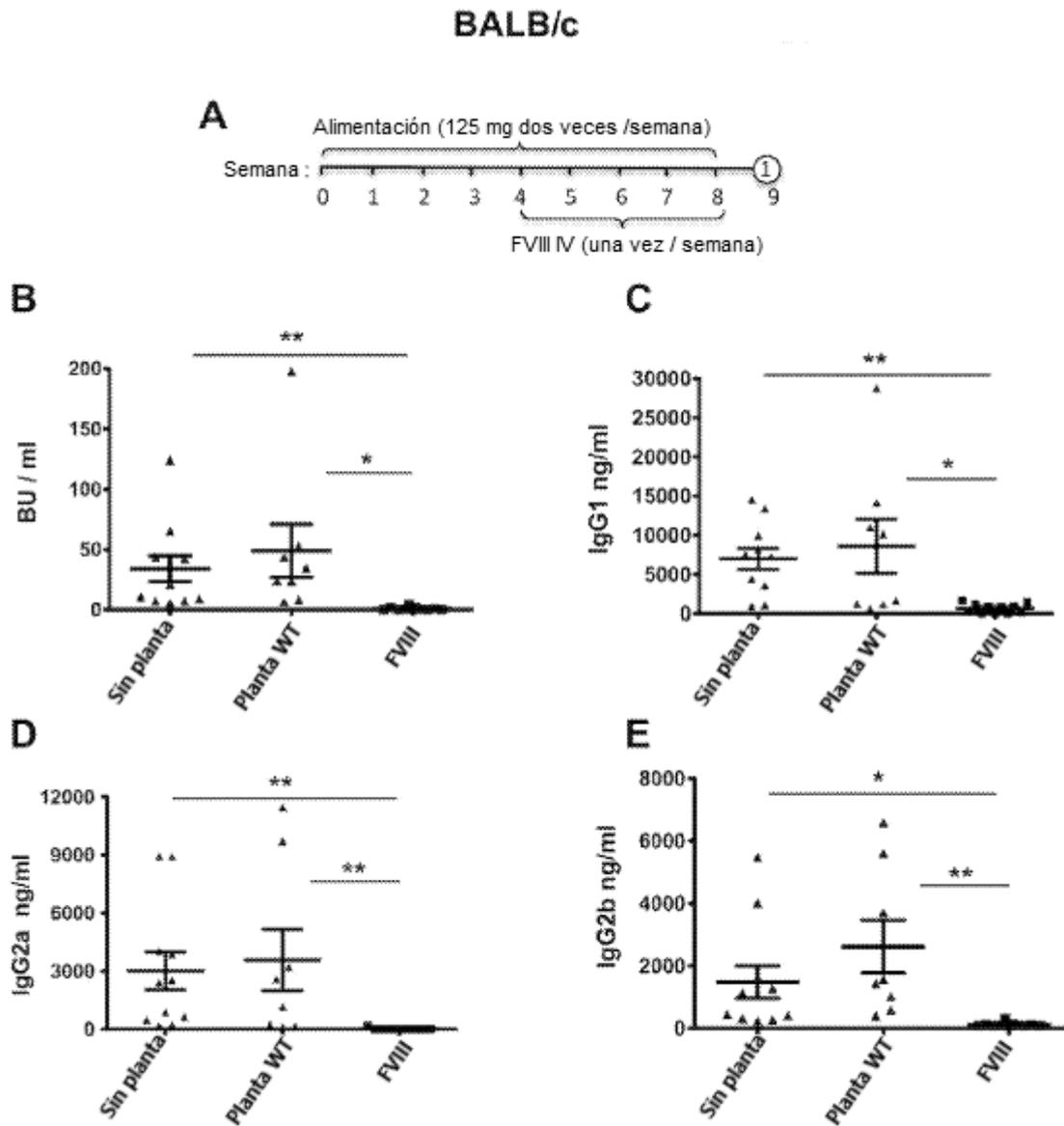


Figura 4

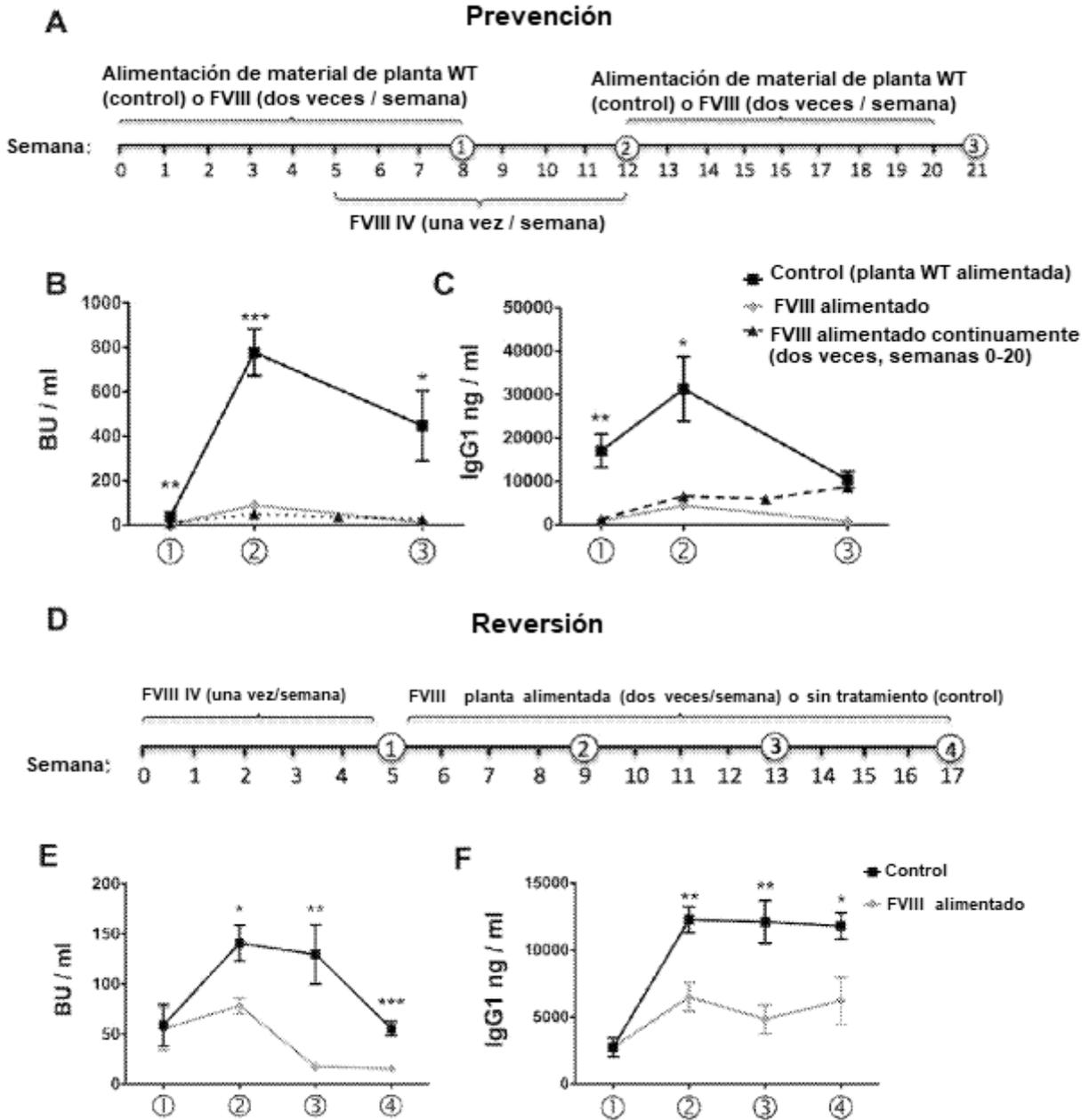


Figura 5

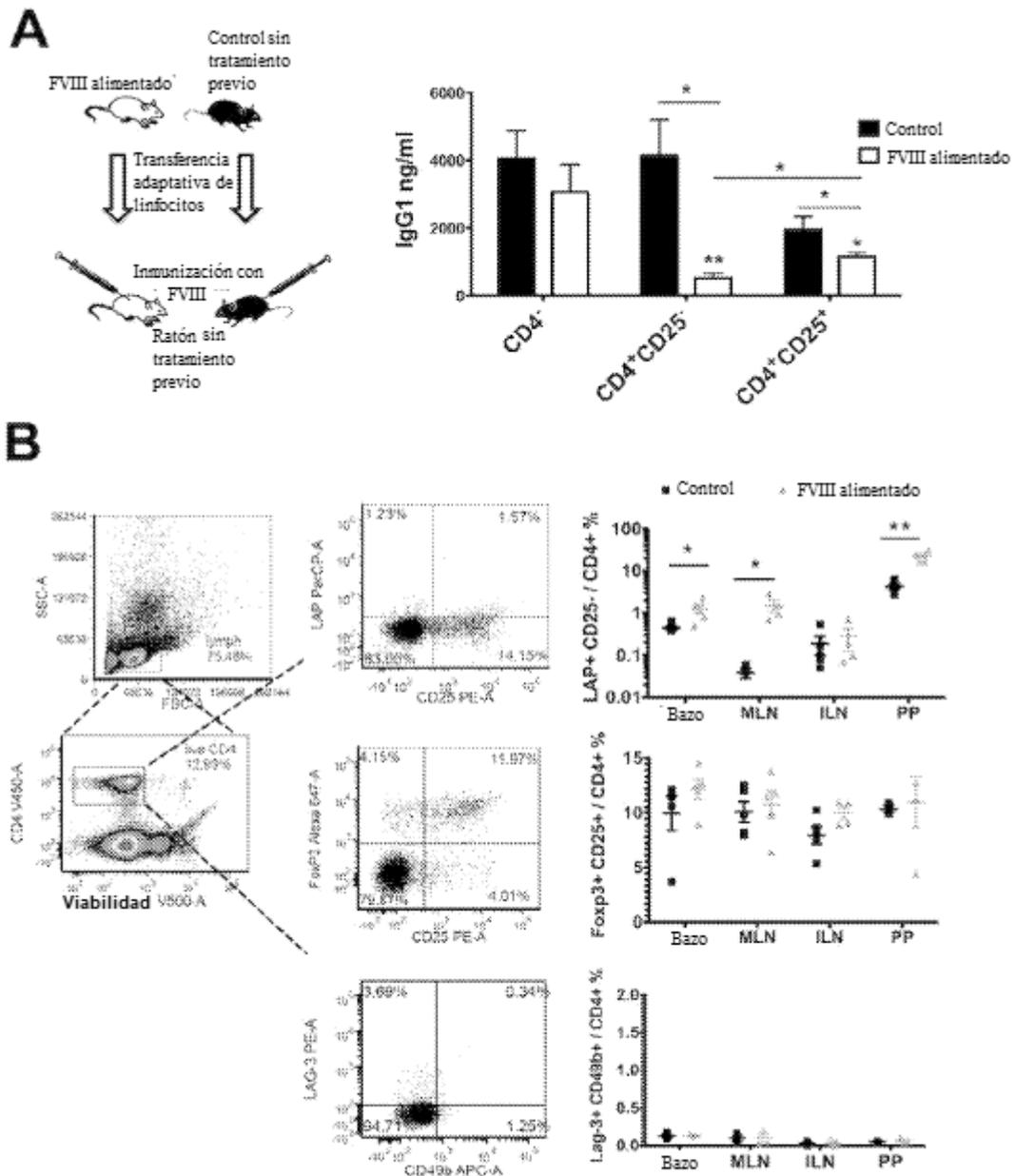


Figura 6

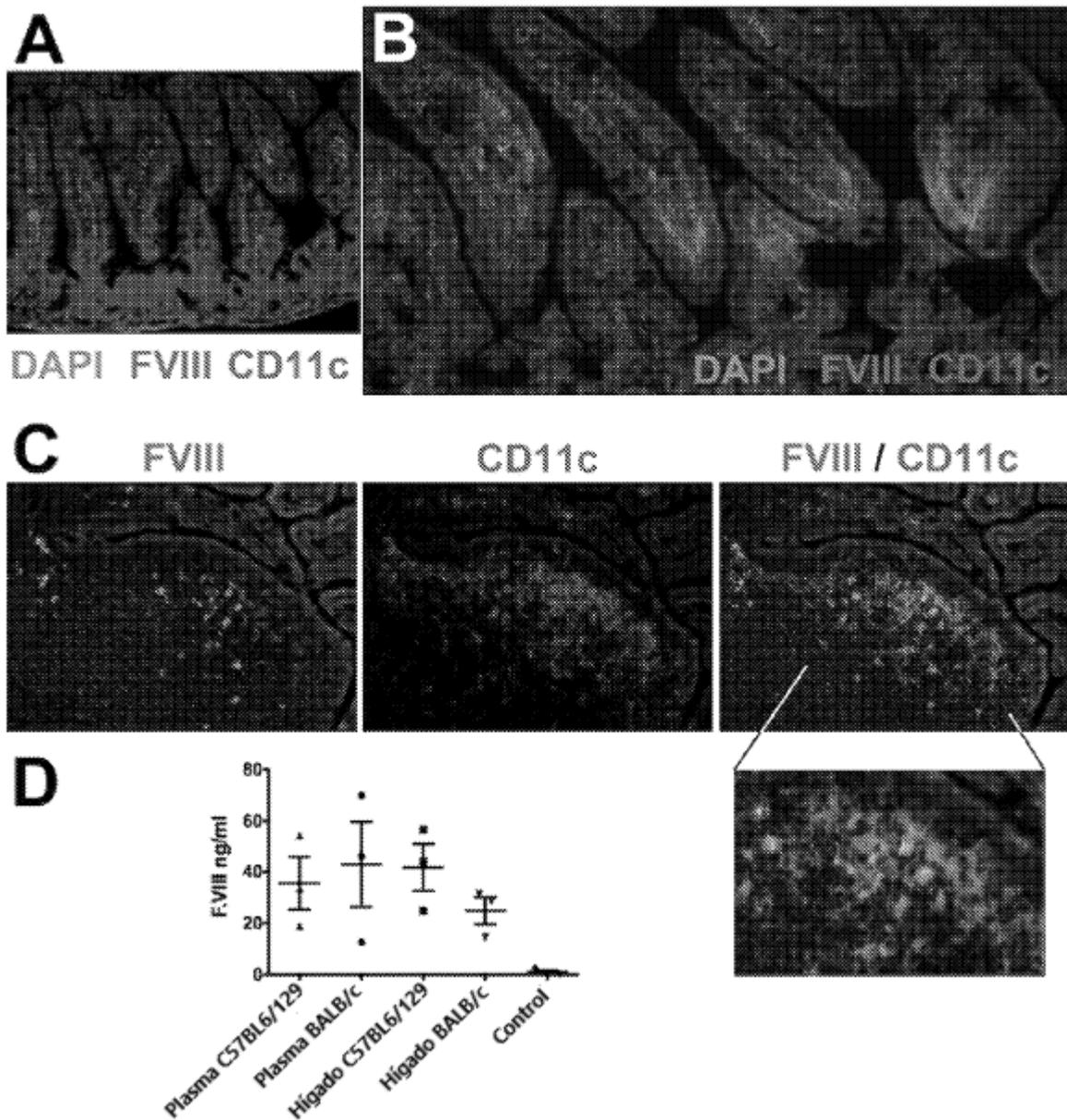


Figura 7

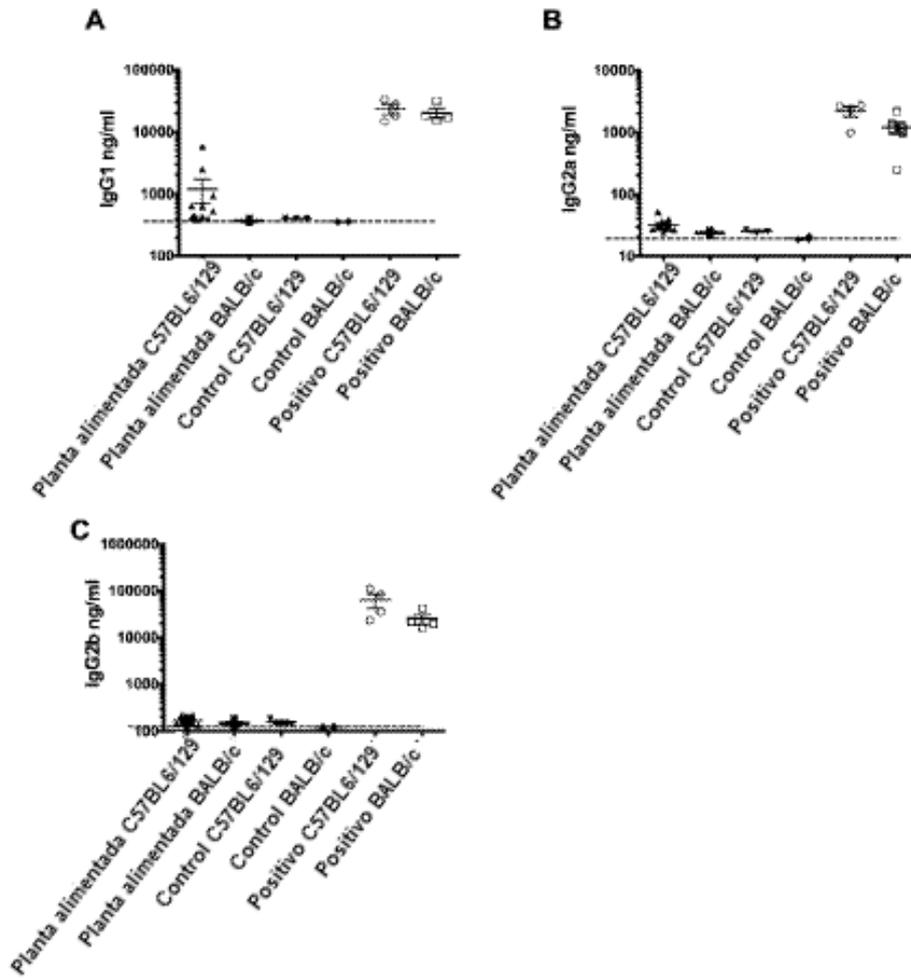


Figura 8

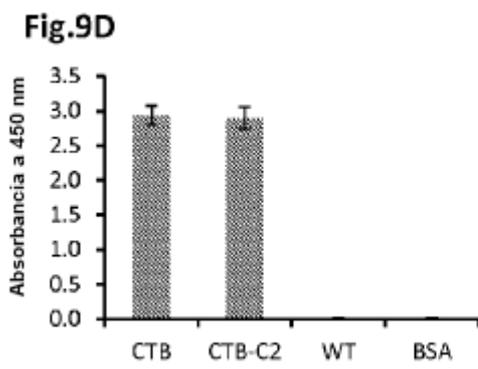
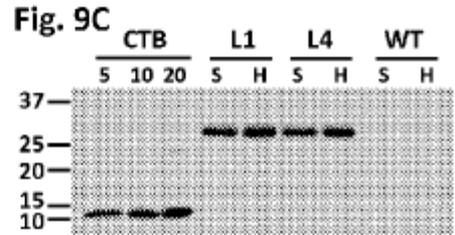
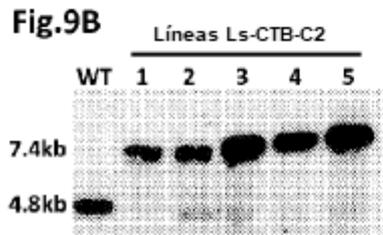
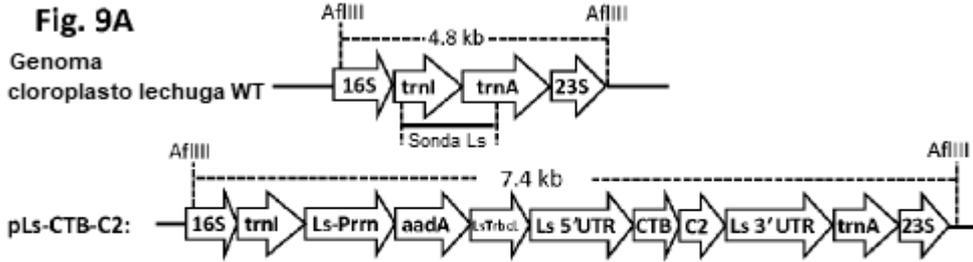


Fig. 9E

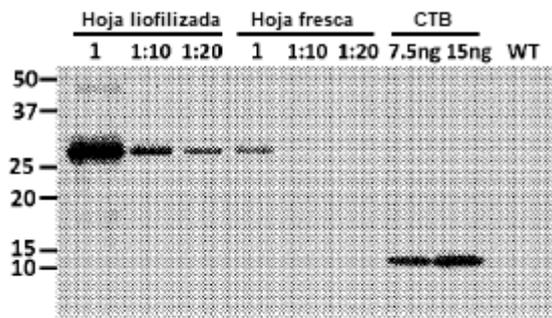


Fig. 9F

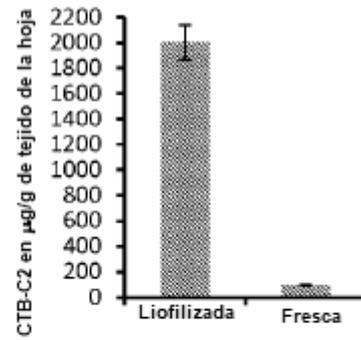


Fig. 9G

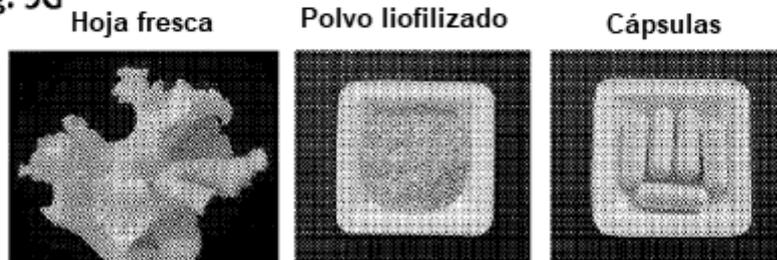


Fig. 10A

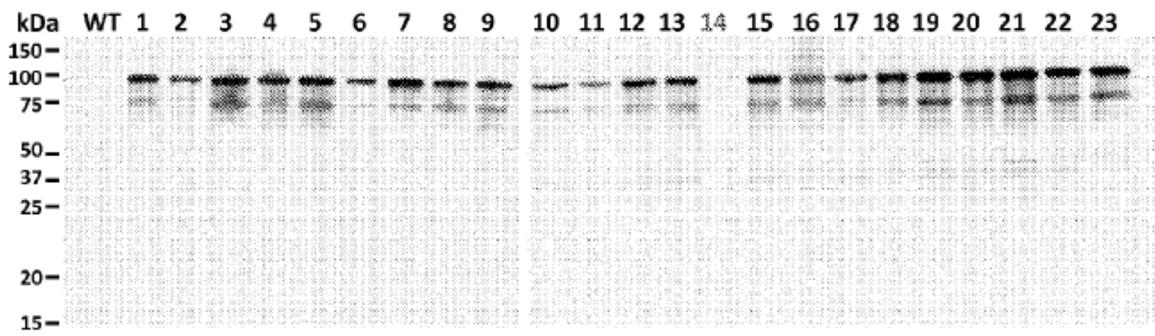


Fig. 10B

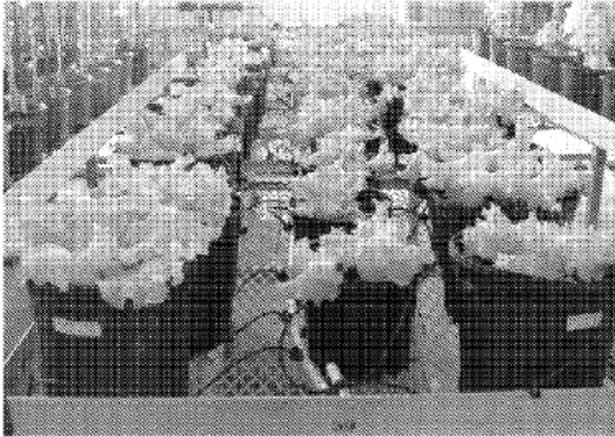


Fig .11A

