



**HAL**  
open science

# Traitement de l'hémophilie A à l'aide d'ARNm codant le facteur VIII et prévention de la réponse immunitaire dirigée contre le facteur VIII thérapeutique

Jules Russick

► **To cite this version:**

Jules Russick. Traitement de l'hémophilie A à l'aide d'ARNm codant le facteur VIII et prévention de la réponse immunitaire dirigée contre le facteur VIII thérapeutique. Immunologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS362 . tel-02865552

**HAL Id: tel-02865552**

**<https://theses.hal.science/tel-02865552>**

Submitted on 11 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**SORBONNE  
UNIVERSITÉ**  
CRÉATEURS DE FUTURS  
DEPUIS 1257



**Inserm**

La science pour la santé  
From science to health

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE**

**SORBONNE UNIVERSITE**

**Ecole Doctorale** : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

**Spécialité** : Immunologie

Présentée par :

**Jules RUSSICK**

Pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'université Sorbonne Université**

Sujet de la thèse

**Traitement de l'hémophilie A à l'aide d'ARNm codant le FVIII  
et prévention de la réponse immunitaire anti-FVIII**

Soutenue le 17 Septembre 2018

Devant le jury composé de :

**Mme Isabelle CREMER**, Professeur, Université Sorbonne Université  
**M Bernard MAILLERE**, Directeur de recherche, CEA  
**M Federico MINGOZZI**, PhD, Généthon  
**M Peter LENTING**, Directeur de recherche, INSERM  
**M Yohann REPESSE**, Maître de Conférence, CHU de Caen  
**M Sébastien LACROIX-DESMAZES**, Directeur de recherche, INSERM

(Présidente)  
(Rapporteur)  
(Rapporteur)  
(Examineur)  
(Examineur)  
(Directeur de thèse)

## ***REMERCIEMENTS***

## Résumé

L'hémophilie A est une maladie rare liée au chromosome X due à l'absence de facteur VIII (FVIII) fonctionnel de la coagulation. Elle est causée par une mutation du gène F8 et se traduit par des symptômes cliniques plus ou moins invalidants selon la sévérité de la maladie. On constate l'apparition d'hémorragies ponctuelles suite à un traumatisme pour les formes les plus légères, des hémorragies spontanées au niveau des articulations (hémarthroses) ou des tissus mous (hématomes) qui peuvent provoquer des arthropathies invalidantes ou mettre le pronostic vital en jeu. La prévention ou le traitement des saignements se fait par injection de FVIII thérapeutique recombinant. L'injection de ce FVIII exogène provoque, chez 25 à 30% des patients, l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII. Cette réponse immunitaire se traduit par l'apparition d'anticorps anti-FVIII qui neutralisent l'activité pro-coagulante du FVIII, appelés donc « inhibiteurs ». Cette complication de la thérapie de substitution mène les patients à une impasse thérapeutique. La réponse anti-FVIII est décrite comme une réponse immunitaire T-dépendante classique au cours de laquelle le FVIII est endocyté et apprêté par des cellules présentatrices d'antigène. Les peptides du FVIII sont présentés sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et reconnus par des lymphocytes T naïfs via leur récepteur (TCR). Ils s'activent et activent à leur tour des lymphocytes B via leur récepteur (BCR) qui, après activation, se différencient en plasmocytes et synthétisent les inhibiteurs, ou en lymphocytes B mémoires qui, lors d'une nouvelle rencontre du FVIII, pourront déclencher une réponse plus forte et plus rapide. La stratégie la plus couramment utilisée pour traiter les patients avec inhibiteurs l'induction de tolérance immunitaire (ITI) et consiste en l'injection répétée de fortes doses de FVIII sur une longue période. Cependant, ce traitement est extrêmement contraignant pour le patient, est très coûteux et n'est efficace que dans 60 à 80% des cas.

Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord souhaité proposer et valider une nouvelle stratégie thérapeutique, alternative à la thérapie de substitution, utilisant un ARNm codant le FVIII. La courte demi-vie du FVIII (environ 12h) oblige les patients à des injections régulières de FVIII. L'utilisation d'un ARNm codant le FVIII permettrait une production plus longue de FVIII, sans se confronter aux difficultés induites par la thérapie génique. J'ai ainsi montré que les ARNm codant le FVIII, lorsqu'ils sont formulés dans des nanoparticules lipidiques (LNP), permettent la production de FVIII endogène *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'injection de 3µg d'ARNm permet d'atteindre, 24h après l'injection, 40% des taux

normaux de FVIII et permet une présence de 6 fois plus de FVIII que la quantité de FVIII injectée lors de la thérapie de substitution. Tout comme le FVIII thérapeutique, le FVIII endogène est retrouvé dans la zone marginale de la rate, mais je n'ai détecté aucune production hépatique. Enfin, j'ai démontré qu'une seule injection d'ARNm permet une correction totale du phénotype hémorragique chez la souris déficiente en FVIII.

Le deuxième aspect de ma thèse a consisté à étudier la possibilité d'inhiber la réponse immunitaire anti-FVIII par inhibition des lymphocytes B via l'inhibition de la voie de signalisation du BCR. Avec Sandrine Delignat, nous avons ainsi étudié l'effet d'un inhibiteur de la Bruton's Tyrosine Kinase (Btk), une kinase centrale dans l'activation du lymphocyte B. Nous avons ainsi montré que l'inhibition de la Btk ne permettait pas de prévenir l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII. En revanche, des expériences de transfert adoptif chez des souris déficientes en FVIII nous ont permis de montrer que cette inhibition permet d'altérer la réponse mémoire anti-FVIII. En effet, les souris qui ont reçu des lymphocytes B mémoires spécifiques du FVIII ne développent pas de réponse mémoire lorsqu'elles sont traitées avec l'inhibiteur de la Btk, en plus du FVIII. A l'inverse, on constate l'apparition d'inhibiteurs chez les souris simplement traitées avec du FVIII après le transfert de lymphocytes B mémoire. Des expériences *in vitro* nous ont également permis de montrer que cette inhibition de la Btk avait pour effet l'inhibition de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes.

Enfin, la dernière partie de ma thèse m'a permis de caractériser une lignée de souris hémophiles transgéniques pour l'allèle HLA-DRB1\*01:01 du CMH II humain. J'ai en effet caractérisé des souris déficientes en FVIII, pour les CMH I et II murins, mais exprimant les CMH I et II humains. J'ai ainsi montré que ces souris naïves produisaient plus d'IgM et moins d'IgG que les souris hémophiles exprimant les CMH murins. J'ai également montré que cela est associé à une modification du nombre de lymphocytes B folliculaires, mais pas du nombre de cellules présentatrices d'antigène. De plus, les lymphocytes T ont la même capacité à proliférer dans les deux lignées. J'ai ensuite caractérisé la réponse immunitaire anti-FVIII chez ces souris et j'ai confirmé la prévalence des IgM anti-FVIII par rapport aux IgG anti-FVIII et confirmé la même prolifération des lymphocytes T en réponse au FVIII. J'ai étudié l'expression du CMH humain par les cellules présentatrices d'antigène de ces souris et, si j'ai confirmé la perte d'expression du CMH murin, je n'ai pas détecté d'expression du CMH humain.

Les résultats obtenus lors de ma thèse permettent d'envisager une autre stratégie pour le traitement des patients hémophiles. La technologie des ARNm transcrits *in vitro* (IVT mRNA) permet la production de molécules endogènes, même dans le cas où, comme pour le FVIII, les taux de traduction sont très faibles. Des études restent cependant à mener quant à l'immunogénicité de cette stratégie, ainsi qu'à la possibilité d'améliorer le ciblage des cellules transfectées après injection. De même, des études approfondies sont à mener pour améliorer la stratégie d'inhibition de la Btk. Si ce traitement permet l'inhibition de la réponse mémoire, il serait intéressant d'améliorer sa spécificité. L'inhibition ne touche que les lymphocytes B qui fixent un antigène sur le BCR, mais quel que soit cet antigène. Enfin, la possibilité d'avoir un modèle murin exprimant un CMH II humain ouvre la voie à de très nombreux projets. En effet, une étude des peptides présentés par le HLA-DRB1\*01:01 deviendrait possible, ainsi que la génération de FVIII muté sur les peptides T reconnus par cet allèle. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires afin de comprendre les mécanismes responsables de l'absence de CMH II à la surface des cellules de cette lignée transgénique.

## Liste des publications

Ce travail de thèse repose sur les publications suivantes :

Article 1 : **Jules Russick**, Sandrine Delignat, Peter Milanov, Olivier Christophe, Gabor Boros, Katalin Kariko, Srinivasa V Kaveri, Sébastien Lacroix-Demazes

Correction of bleeding in experimental severe hemophilia A by systemic delivery of factor VIII-encoding mRNA (Soumis à Blood et refusé, en cours de réécriture)

Article 2 : Sandrine Delignat, **Jules Russick**, Bagirath Gangadharan, Julie Rayes, Mathieu Ing, Jan Voorberg, Srinivasa V Kaveri, and Sébastien Lacroix-Desmazes

Prevention of the anti-factor VIII memory B-cell response by inhibition of the Bruton's tyrosine kinase in experimental hemophilia A (Soumis à Haematologica)

Article 3 : **Jules Russick**, Sandrine Delignat, Yu-Chun Lone, Marc Pallardy, Srinivasa V Kaveri, Sébastien Lacroix-Desmazes

Generation of humanized FVIII-deficient HLA-DRB1\*01:01-transgenic mice (En préparation, non soumis)

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>I. HÉMOPHILIE A ET FVIII</b> .....	<b>14</b>
1. HISTORIQUE DE L'HEMOPHILIE .....	14
2. DESCRIPTION DE L'HEMOPHILIE A .....	14
3. GENETIQUE DE L'HEMOPHILIE A .....	15
<i>Le gène F8</i> .....	15
<i>Anomalies génétiques menant à l'hémophilie A</i> .....	16
4. CYCLE DE VIE DU FVIII .....	17
<i>Description du FVIII</i> .....	17
<i>Synthèse du FVIII</i> .....	18
<i>Demi-vie du FVIII</i> .....	19
<i>Rôle du FVIII</i> .....	20
<i>Catabolisme du FVIII</i> .....	23
<b>II. TRAITEMENTS DE L'HEMOPHILIE A ET OPTIONS THERAPEUTIQUES</b> .....	<b>24</b>
1. TRAITEMENTS ACTUELS .....	24
<i>FVIII thérapeutiques</i> .....	24
<i>Thérapies sans FVIII</i> .....	25
2. NOUVELLES STRATEGIES .....	26
<i>FVIII à longue durée de vie</i> .....	27
<i>Emicizumab</i> .....	29
<i>Thérapie génique</i> .....	31
<b>III. COMPLICATION DU TRAITEMENT</b> .....	<b>33</b>
1. IMMUNOGENICITE DU FVIII THERAPEUTIQUE .....	33
2. FACTEURS DE RISQUES INTRINSEQUES AUX PATIENTS .....	34
<i>Anomalies du gène codant le FVIII</i> .....	34
<i>Autres gènes</i> .....	35
<i>Ethnie</i> .....	35
3. AUTRES FACTEURS DE RISQUES .....	36
<i>Antécédent de traitement</i> .....	36
<i>Le FVIII lui-même</i> .....	36
<i>Intensité du traitement</i> .....	37
<i>Traitement prophylactique ou à la demande</i> .....	38
<i>Changement de produit</i> .....	40
4. REPONSE IMMUNITAIRE .....	42
<i>Description générale de la réponse anti-FVIII thérapeutique</i> .....	45
<i>Endocytose et apprêtement du FVIII</i> .....	46
<i>CD206 et récepteurs d'endocytose</i> .....	47
<i>vWF et endocytose</i> .....	48
<i>FVIII à longue durée de vie et endocytose</i> .....	50
<i>Présentation aux lymphocytes T</i> .....	51
<i>Rôle des lymphocytes B</i> .....	54
<b>IV. STRATEGIES D'INDUCTION DE TOLERANCE AU FVIII</b> .....	<b>57</b>
1. INDUCTION DE TOLERANCE IMMUNITAIRE (ITI) .....	57
<i>Description des protocoles d'ITI</i> .....	57
<i>Mécanismes d'induction de tolérance</i> .....	58
2. NOUVELLES STRATEGIES D'INDUCTION DE TOLERANCE .....	61
<b>V. OBJECTIFS</b> .....	<b>63</b>



<b>RESULTATS.....</b>	<b>65</b>
<b>I. CORRECTION DES SAIGNEMENTS PAR INJECTION D'ARNM CODANT LE FVIII DANS UN MODELE MURIN D'HEMOPHILIE A.....</b>	<b>66</b>
<b>II. PREVENTION DE LA REPOSE MEMOIRE ANTI-FVIII PAR INHIBITION DE LA 'BRUTON'S TYROSINE KINASE' (BTK) CHEZ LA SOURIS DEFICIENTE EN FVIII.....</b>	<b>102</b>
<b>III. CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MODELE MURIN DEFICIENT EN FVIII ET HUMANISE POUR LE HLA-DRB1*01:01.....</b>	<b>132</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>177</b>

## Table des figures

<b>Figure 1. Production du FVIII.</b>	<b>16</b>
<b>Figure 2. Clivage intracellulaire du FVIII.</b>	<b>19</b>
<b>Figure 3. Activation du FVIII.</b>	<b>21</b>
<b>Figure 4. Cascade de la coagulation.</b>	<b>22</b>
<b>Figure 5. Régulateurs naturels de la cascade de la coagulation et stratégies pour les inhiber.</b>	<b>26</b>
<b>Figure 6. FVIII à longue durée de vie et essais cliniques correspondants.</b>	<b>29</b>
<b>Figure 7. Schéma du mode d'action du FVIIIa ou de l'Emicizumab.</b>	<b>30</b>
<b>Figure 8. Représentation schématique de la théorie du danger.</b>	<b>38</b>
<b>Figure 9. Représentation schématique de la théorie de la discontinuité de l'antigène.</b>	<b>39</b>
<b>Figure 10. Facteurs de risques liés à l'apparition d'inhibiteurs.</b>	<b>41</b>
<b>Figure 11. Score clinique CANAL (Concerted Action on Neutralizing Antibodies in patients with severe haemophilia A).</b>	<b>42</b>
<b>Figure 12. Réponse immunitaire anti-FVIII.</b>	<b>46</b>
<b>Figure 13. Récepteurs capables de fixer le FVIII et/ou le vWF</b>	<b>50</b>
<b>Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation du BCR.</b>	<b>103</b>

## Abréviations

aa	acide aminé
AAV	Adeno-Associated Virus
ABR	Annual Bleeding Rate
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
aPC	Activated Protein C
aPCC	activated Prothrombin Complex Concentrates
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
AT	Antithrombine
BCR	B Cell Receptor
BDD FVIII	B Domain Deleted FVIII
Btk	Bruton's Tyrosine Kinase
CANAL	Concerted Action on Neutralizing Antibodies in patients with severe haemophilia A
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity
CG	Centre Germinatif
CHAMP	CDC Hemophilia A Mutation Project
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMH (I ou II)	Complexe Majeur d'Histocompatibilité (de classe I ou II)
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DC	Dendritic cells

EPO	Erythropoïétine
FcR (n)	Fc Receptor (neontatal)
FT	Facteur Tissulaire
FVIII(a)	Facteur VIII (activé)
HIGM	Syndrome d'Hyper IgM
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN $\gamma$	Interféron gamma
Ig (G)	Immunoglobuline (de classe G)
IgIV	Immunoglobulines Intraveineuses
IL	Interleukines
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITI	Induction de Tolérance Immunitaire
iTreg	induced Treg
IVT mRNA	<i>In vitro</i> Transcribed mRNA
LB	Lymphocyte B
LNP	Lipid NanoParticle
LT (h)	Lymphocytes T (helper)
miRNA	micro RNA
MO-DC	Monocyte-derived Dendritic Cells
NK cells	Natural Killer cells
nTreg	natural Treg
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
pdFVIII	Plasma Derived FVIII
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase C- $\gamma$ 2
PTPs	Previously Treated Patients
PUPs	Previously Untreated Patients
RE	Réticulum Endoplasmique

rFVIII	recombinant FVIII
scFVIII	single chain FVIII
siRNA	short interfering mRNA
TCR	T Cell Receptor
Teff	LT effecteur
Tfh	LT follicular helper
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
Treg	LT régulateur
UB	Unité Bethesda
UPR	Unfolded Protein Response
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vWF	Facteur Willebrand
XLA	X-Linked Agammaglobulinemia

# INTRODUCTION

## I. Hémophilie A et FVIII

### 1. Historique de l'hémophilie

Bien avant sa description et sa caractérisation, l'hémophilie est évoquée dès le I<sup>er</sup> siècle de notre ère. Rabban Shimon ben Gam liel (environ -10 av. JC – 70 ap. JC) interdit en effet la circoncision d'un garçon, car les fils de trois de ses tantes sont décédés de saignements consécutifs à l'acte. Un siècle plus tard, Rabbi Juda Ha-Nassi autorise dans la Mishna (première partie du Talmud), qu'un bébé de sexe masculin ne soit pas circoncis, si deux de ses frères sont déjà décédés de saignements suite à cette pratique<sup>1,2</sup>.

Au cours du XIX<sup>e</sup> siècle, de nombreuses appellations sont utilisées pour décrire ce syndrome : idiosyncrasie hémorragique, hématophilie, diathèse hémorragique héréditaire, maladie hémorragique... Pour la première fois, Hopff utilise en 1828, le terme d' « hémophilie » - haima (sang en grec) et philia (amour)<sup>3</sup>. C'est également au cours de ce siècle que naît la Reine Victoria du Royaume-Uni, porteuse asymptotique d'une mutation causant l'hémophilie. Sa descendance étant présente dans la majorité des cours d'Europe, on trouvera cette mutation dans de très nombreuses familles royales, jusqu'à celle du dernier tsar de Russie. C'est ce qui vaudra à l'hémophilie d'être appelée « la maladie Royale ». Cependant, c'est de l'hémophilie B dont il s'agit ici comme cela a récemment été découvert<sup>4</sup>; depuis 1952 et les travaux d'Aggeler<sup>5</sup> et de Biggs<sup>6</sup>, deux types d'hémophilie sont connus : l'hémophilie A si le gène codant le facteur VIII (FVIII) est invalidé et hémophilie B si c'est celui codant le facteur IX (FIX).

### 2. Description de l'hémophilie A

L'hémophilie A est une maladie hémorragique qui affecte environ 1 naissance masculine sur 5 000<sup>7</sup>, ce qui en fait une des maladies hémorragiques les plus fréquentes<sup>8</sup>. Elle est causée par différentes anomalies du gène *F8* codant pour le FVIII de la coagulation. Ces mutations induisent un déficit quantitatif et/ou qualitatif de FVIII, ce qui se traduit par une importante hétérogénéité phénotypique de la maladie. Selon l'activité résiduelle du FVIII, l'hémophilie est qualifiée de sévère si l'activité résiduelle est inférieure à 1% de celle d'un plasma normal, de modérée entre 1 et 5% ou de mineure si elle est supérieure à 5%<sup>9</sup>.

Ces sévérités concernent respectivement 50%, 10% et 40% des patients hémophiles A<sup>10</sup> et se traduisent par des manifestations cliniques très diverses. Dans les cas les plus légers, les hémorragies sont ponctuelles et font souvent suite à un traumatisme ; par exemple lors d'une petite chirurgie. En revanche, dans les formes les plus sévères de la maladie, des hémorragies peuvent advenir spontanément et de manière chronique. Des hémorragies internes apparaissent en particulier au niveau des articulations (hémarthroses) pouvant déclencher des arthropathies invalidantes et conduire à la paralysie. Ces hémarthroses, très caractéristiques de l'hémophilie, ont d'ailleurs été décrites dès 1890 par König<sup>11</sup>.

Des hémorragies se développent également au niveau des tissus mous (hématomes) qui, lorsqu'elles concernent le cerveau, peuvent engendrer des séquelles neurologiques voire mettre en jeu le pronostic vital<sup>12</sup>. En effet, les hémorragies intracérébrales concernent 7,5% des hémophiles<sup>13</sup> et sont 40 à 80 fois plus fréquentes chez les nouveau-nés hémophiles que dans la population générale<sup>14</sup>.

### 3. Génétique de l'hémophilie A

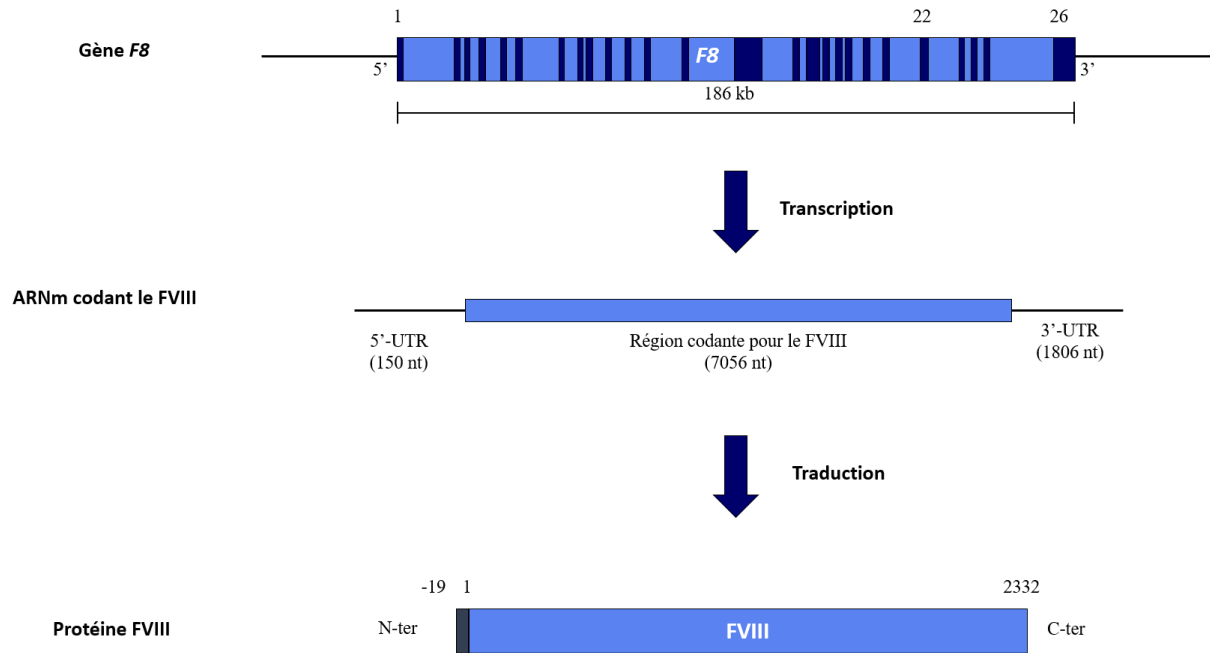
L'hémophilie A est une maladie qui touche presque exclusivement les hommes. C'est ce qu'observe Christian Friedrich Nasse en 1820 en étudiant des familles sujettes à des saignements mortels. Il constate également que les hommes, bien qu'ayant une « disposition héréditaire aux saignements mortels », ne transmettent pas la maladie. C'est la première description de la transmission récessive de l'hémophilie A.

#### Le gène *F8*

Nous savons aujourd'hui que le gène *F8* codant pour le FVIII est situé en position 28 du bras long du chromosome X (Xq28) et que son expression est récessive ; ce qui explique qu'en cas de mutation délétère sur un chromosome X, les femmes soient porteuses de la maladie tandis que les hommes en sont atteints. Ce propos est cependant à nuancer par de rares exceptions de femmes atteintes d'hémophilie A, notamment à cause d'un défaut d'inactivation du chromosome X portant la version muté de *F8*<sup>15</sup>. Le gène codant le FVIII est extrêmement long, puisqu'il s'étend sur 186 kb et est composé de 26 exons<sup>16</sup>. Il est transcrit en un ARN messenger (ARNm) d'environ 9 kb comprenant une région 5' non



traduite (untranslated – 5' UTR) de 150 nucléotides et d'une région 3' UTR de 1806 nucléotides, encadrant la région codante de 7056 nucléotides. Cette région codante est ensuite traduite en une protéine de 2332 acides aminés (aa) précédée d'une séquence signal de 19 aa permettant l'adressage de la protéine au réticulum endoplasmique (RE) puis sa sécrétion.



**Figure 1. Production du FVIII.** Chez l'homme, le gène F8 (bleu clair) est situé en position Xq28 du chromosome X, fait 186 kb et est composé de 26 exons (bleu foncé). Sa transcription engendre un ARNm de 9012 nucléotides (nt) dont 7056 constituent la région codante. La traduction de cette région codante donne une chaîne polypeptidique de 2351 acides aminés (aa) dont les 19 premiers constituent un peptide signal d'adressage au réticulum endoplasmique (gris foncé).

### Anomalies génétiques menant à l'hémophilie A

A l'heure actuelle, des bases de données telles que « CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) » listent près de 3 000 mutations du gène F8 et y associent la sévérité de l'hémophilie observée<sup>17</sup>.

La grande majorité des mutations sont des mutations ponctuelles, c'est-à-dire qu'elles concernent un seul nucléotide. Elles ont des conséquences variables et résultent en une sévérité de la maladie différente. Les mutations non-sens (11,1% des mutations dans CHAMP), qui engendrent l'apparition d'un codon-stop et aboutissent donc à une protéine tronquée, sont associées dans 90% des cas à une hémophilie A sévère. En revanche, les

mutations faux-sens (49%), qui modifient l'acide aminé synthétisé, résultent-elles en des phénotypes différents. Cette variabilité dépend de la région de la protéine concernée et des différences physico-chimiques entre l'acide aminé normal et celui qui le remplace (hydrophobicité, encombrement stérique, polarité). En effet 38% des patients avec ce type de mutation développent une hémophilie A mineure, soit presque autant que de patients chez qui cela engendre une hémophilie A sévère (39%).

Les délétions sont le deuxième type de mutations les plus fréquentes chez les hémophiles A. Elles concernent de petits (<50pb) ou de larges (>50pb) fragments d'ADN, sont donc associées à des sévérités différentes et représentent 23% des mutations de la base de données CHAMP. Ce pourcentage est plus important dans CHAMP que ce que l'on trouve dans la littérature où elles sont estimées entre 5% et 10%<sup>18</sup>.

Concernant les hémophilies A sévères spécifiquement, elles sont consécutives dans 45% des cas à un réarrangement génique qui est l'inversion de l'intron 22<sup>19-22</sup>. Cette inversion, qui est due à la recombinaison de deux régions homologues, mène à la transcription des exons 1 à 22 dans le sens 3'-5' et des exons 22 à 26 dans le sens 5'-3', ce qui aboutit à la synthèse de deux ARNm incomplets.

Enfin, d'autres mutations peuvent modifier le cadre de lecture, ajouter/éliminer des sites de glycosylation de la protéine ou modifier des sites d'épissage. A noter également que dans certains cas, l'hémophilie A n'est pas causée par une mutation dans le gène *F8* à proprement parlé, mais dans ses séquences régulatrices, voire dans d'autres gènes. En effet, certaines mutations concernent des gènes codant des protéines intervenant dans le cycle de vie du FVIII, comme LMAN-1/ERGIC-53<sup>23</sup> ou le facteur Willebrand (vWF)<sup>24</sup>.

#### 4. Cycle de vie du FVIII

##### Description du FVIII

Le FVIII est un cofacteur de la coagulation principalement synthétisé dans le foie<sup>25-27</sup>. Ces résultats ont été confirmés et affinés plus récemment, où des études utilisant soit la détection de l'ARNm codant le FVIII, soit une invalidation conditionnelle de *F8*, ont démontré une production de FVIII par les cellules endothéliales sinusoidales<sup>28</sup>. Il a également été démontré que les cellules endothéliales permettent une synthèse extra-hépatique de FVIII<sup>29,30</sup>. Un système de perfusion de poumons *ex vivo* a par exemple permis

de détecter une production de FVIII par cet organe<sup>31</sup>. De manière générale, le FVIII semble produit par les cellules endothéliales microvasculaires, principalement du foie, mais également de certains autres organes<sup>32</sup>.

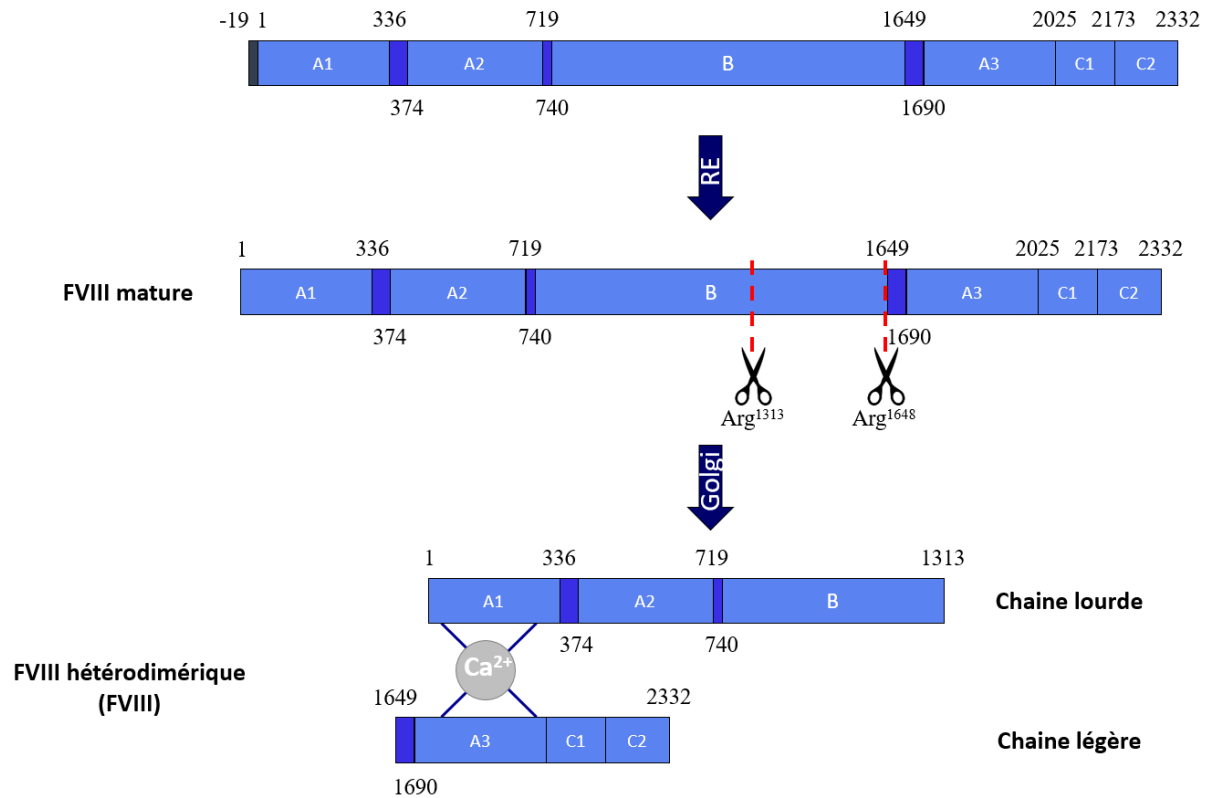
Le FVIII est une glycoprotéine traduite sous forme d'une chaîne polypeptidique de 2351 aa. Elle est alors composée d'un peptide signal de 19 aa à son extrémité N-terminale suivi d'une séquence de 2332 aa divisée en 6 domaines (A1-A2-B-A3-C1-C2). Les trois premiers domaines sont séparés par 30 à 40 aa riches en acides aspartiques (Asp) et acides glutamiques (Glu), appelées « régions acides »<sup>33</sup> et nommées a1, a2 et a3. Les domaines A possèdent environ 40% d'homologie entre eux, avec le facteur V de la coagulation et avec la céruloplasmine<sup>34</sup>. De la même façon, les domaines C présentent des homologies avec les domaines C du facteur V. Le domaine B lui, ne montre aucune homologie avec d'autres protéines<sup>35</sup>.

### Synthèse du FVIII

La séquence signal permet l'adressage à la lumière du réticulum endoplasmique où elle est clivée, donnant la protéine mature de 2332 aa. C'est dans le RE que le FVIII subit des N-glycosylations et interagit avec la calréticuline et la calnexine<sup>36</sup>. Une large proportion (80%) interagit également avec la protéine BiP via le domaine A1, qui le retient dans le RE pour dégradation<sup>37,38</sup>. Le reste passe dans l'appareil de Golgi de manière ATP-dépendante où la maturation du FVIII se poursuit. Dans le Golgi, les N-glycosylations se complexifient, des O-glycosylations et des sulfatations apparaissent. C'est également le lieu des premières protéolyses menant au FVIII fonctionnel.

En effet, le FVIII est clivé par une (des) protéase(s) intracellulaire(s) au niveau de l'arginine 1613 (Arg<sup>1613</sup>) et de l'arginine 1648 (Arg<sup>1648</sup>). Si la protéase clivant en position 1648 a été décrite comme étant la furine<sup>39,40</sup>, son identité reste malgré tout controversée<sup>41</sup>. Quoiqu'il en soit, ce clivage en fin de domaine B aboutit à la séparation de la chaîne lourde (A1-a1-A2-a2-B) d'une part et de la chaîne légère (a3-A3-C1-C2) d'autre part. Ces 2 chaînes sont reliées de manière non covalente par les domaines A1 et A3, par l'intermédiaire d'ions métalliques divalents, notamment le calcium, le cuivre ou le manganèse<sup>42,43</sup>. Cependant, il semble que les ions cuivre présents dans molécule de FVIII jouent plutôt un rôle auxiliaire dans l'amélioration de l'activité cofacteur du FVIII, que

dans l'association de ses deux chaînes<sup>44</sup>. C'est sous cette forme hétérodimérique inactive qu'est sécrété le FVIII et qu'il circule dans le plasma à environ 0,1 µg/mL.



**Figure 2. Clivage intracellulaire du FVIII.** Dans le réticulum endoplasmique, la séquence signal est clivée et le polypeptide de 2332 aa est clivé au niveau des Arg1313 et Arg1648 dans l'appareil de Golgi. C'est également dans l'appareil de Golgi que le FVIII subit des modifications post-traductionnelles, comme des O-glycosylations, des N-glycosylations et des sulfatations de tyrosines spécifiques. Le FVIII est alors sous forme hétérodimérique, avec une chaîne lourde (domaines A1-a1-A2-a2-B) et une chaîne légère (domaines a3-A3-C1-C2). Les deux chaînes sont associées de manière non covalente par un ion divalent entre les domaines A1 et A3. Il est sécrété sous cette forme dans le sang et interagit immédiatement avec le vWF.

### Demi-vie du FVIII

Immédiatement après sa sécrétion dans la circulation, le FVIII se fixe à sa protéine chaperonne, le vWF. Il a en effet été déterminé que 50% du FVIII est complexé au vWF en seulement 2 secondes<sup>45</sup>. De plus, il se fixe environ 50 molécules de vWF par molécule de FVIII et cette interaction est caractérisée par une forte affinité (entre 0.1 et 0.9 nM), mais également une dissociation très rapide ( $6,89 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )<sup>46</sup>. Cette interaction se fait via les deux extrémités de la chaîne légère, à la position Tyr<sup>1680</sup> préalablement sulfatée dans le Golgi<sup>47,48</sup> et via le domaine C2<sup>49,50</sup>. Le premier rôle de l'interaction avec le facteur

Willebrand est de protéger le FVIII d'une inactivation prématurée du FVIII par les protéases et permet qu'il ne s'active qu'à proximité d'une lésion vasculaire jusqu'où il l'escorte.

Par ailleurs, le vWF évite également une reconnaissance par les récepteurs impliqués dans le catabolisme du FVIII et augmente ainsi considérablement sa demi-vie. En effet, chez les individus ayant des taux normaux de vWF, la demi-vie du FVIII est d'environ 12 heures<sup>51</sup>. En revanche, chez les patients atteints de déficiences en vWF (maladie de Willebrand de type 3), elle est de 2,8 heures en moyenne<sup>52</sup>. Il a d'ailleurs été montré que chez les patients hémophiles A, 0,1 unité/mL de vWF en plus augmente de 17 minutes la demi-vie du FVIII<sup>53</sup>. Cependant, le vWF circule en excès par rapport au FVIII, ce qui signifie que cet effet est vrai à faible dose de vWF<sup>54</sup>. En revanche, la pertinence de cette observation chez les patients avec des taux normaux de vWF est limitée, comme en témoigne la moindre augmentation dans une cohorte de plus de 11 000 individus<sup>55</sup>.

Enfin, nous verrons dans les chapitres suivants que le vWF joue également un rôle prépondérant quant à l'immunogénicité du FVIII.

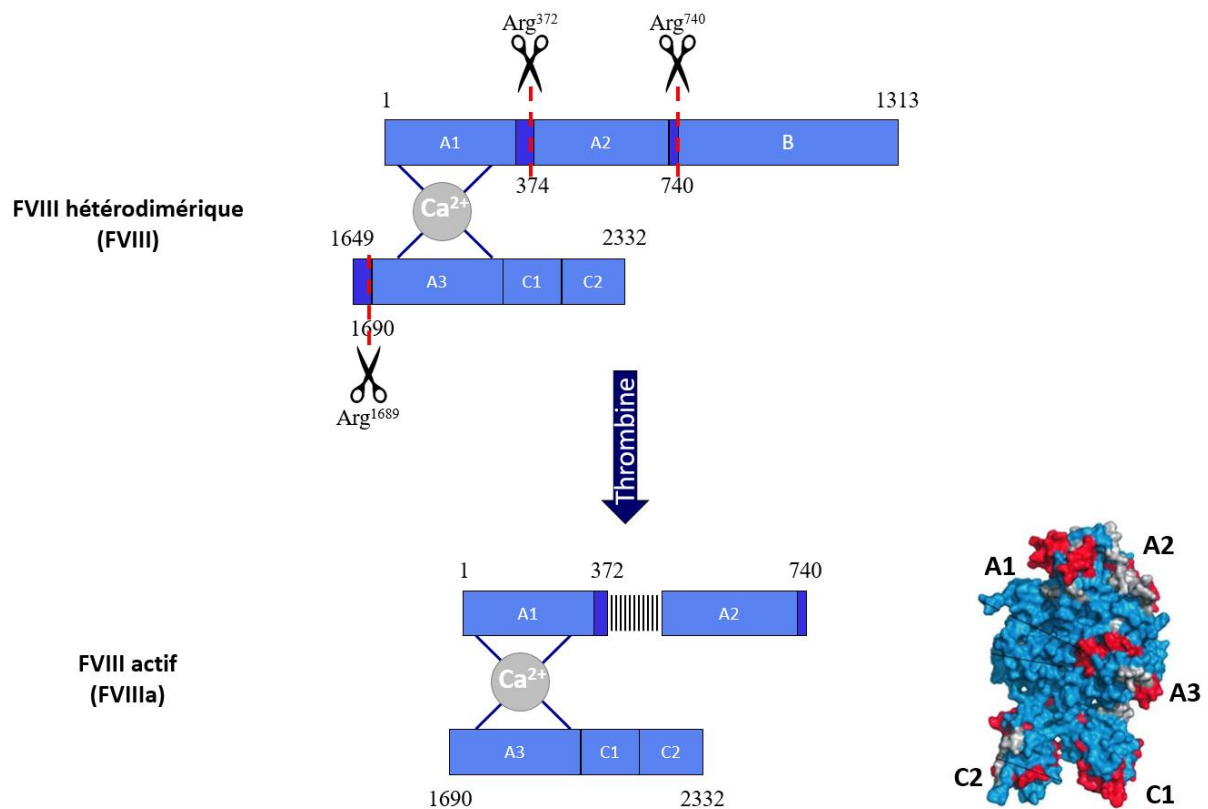
### Rôle du FVIII

Lorsqu'une brèche vasculaire apparaît, elle expose le sous-endothélium et sa matrice de collagène à la circulation. Grâce à une vasoconstriction concomitante, les plaquettes sont ralenties et adhèrent à la matrice, s'agrègent et s'activent pour recruter encore plus de plaquettes et ainsi aboutir à la formation d'un clou plaquettaire. L'ensemble de ce processus correspond à l'hémostase primaire et donne lieu à la formation d'un clou hémostatique. Chez les patients hémophiles A, l'hémostase primaire est normale. Cependant, la présence de ce clou ne suffit pas à collapser la brèche pour une bonne coagulation. Il doit être solidifié pour être stabilisé et c'est à cette fin qu'est activée la cascade de la coagulation.

La cascade de la coagulation consiste en l'activation séquentielle de zymogènes (précurseurs enzymatiques inactifs) par l'enzyme présente en amont dans la cascade. Ces enzymes, appelées « facteurs » sont des sérines protéases qui doivent être clivées pour devenir actives. Une fois actives, elles clivent à leur tour le facteur suivant grâce et leur

cofacteur glycoprotéique qui catalyse la réaction. La cascade de la coagulation débute de deux façons distinctes : par la voie extrinsèque et par la voie intrinsèque.

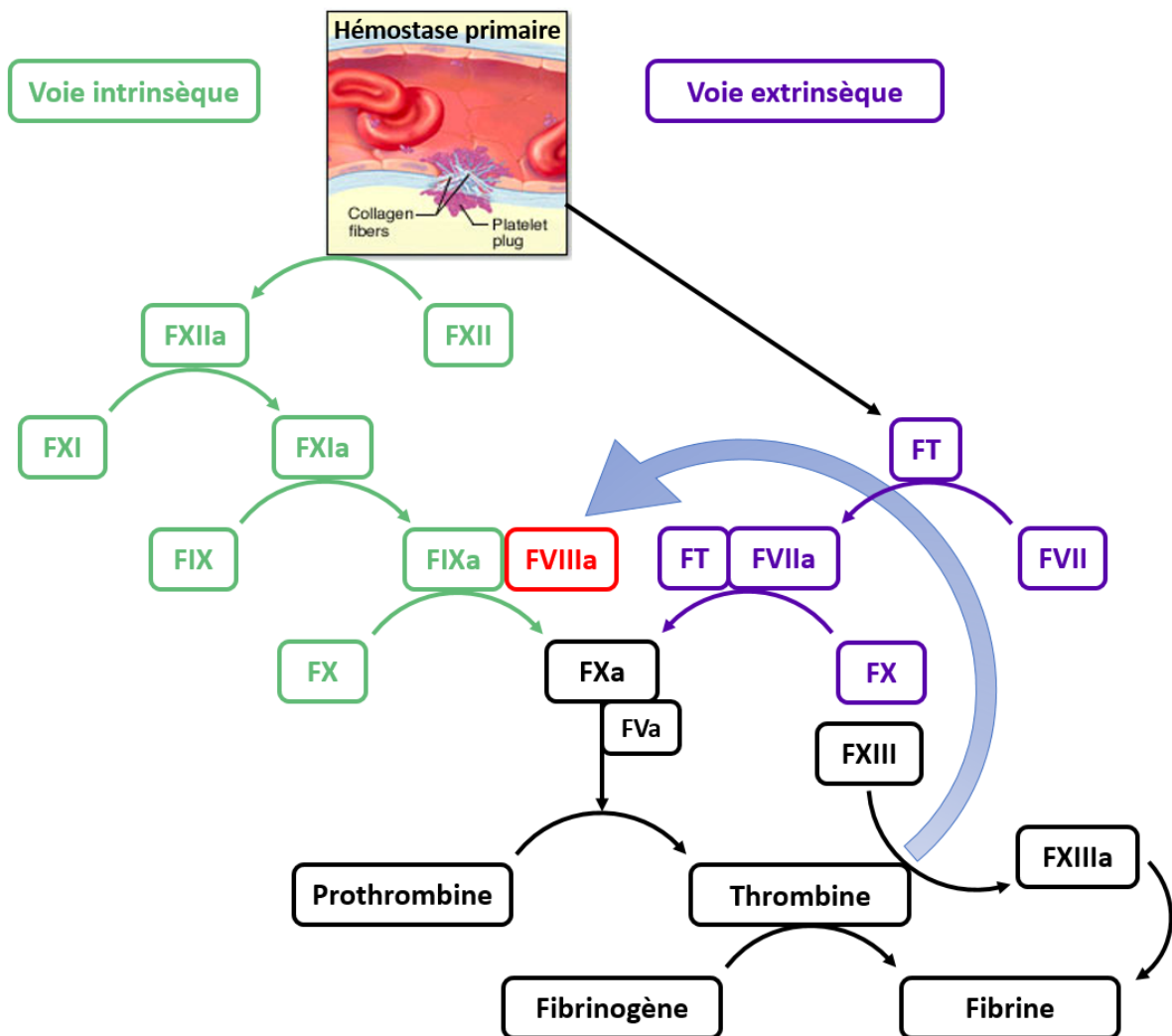
La voie extrinsèque se déclenche via le facteur tissulaire (FT) exposé, en plus du collagène, lors de la lésion vasculaire. Ce FT active le Facteur VII présent dans le plasma en facteur VII activé (FVII → FVIIa). Le complexe FT-FVIIa active alors le Facteur X (FX → FXa). Le FXa génère un peu de FVa<sup>56</sup> auquel il se lie pour former le complexe prothrombinase, clive la prothrombine et permet la génération des premières molécules de thrombine. Cette thrombine clive le FVIII au niveau de l'Arg<sup>372</sup>, l'Arg<sup>740</sup> et l'Arg<sup>1689</sup> avec pour conséquence son activation (FVIII → FVIIIa)<sup>57</sup>.



**Figure 3. Activation du FVIII.** Lors de la cascade de la coagulation, la thrombine active le FVIII en le clivant au niveau de la chaîne lourde (Arg372 et Arg740) et de la chaîne légère (Arg1689) pour générer FVIII actif (FVIIIa). Les domaines a1 et A2 interagissent alors par des interactions faibles (|||||), le FVIII est alors amputé du domaine B et libéré du vWF. Il peut se lier aux phospholipides via son domaine C2 et interagit avec le FIXa via ses domaines A2 et A3. En bas à droite : Structure cristallographique du FVIII (D'après van den Biggelaar et al., J. Biol. Chem., 2015).

En parallèle, la voie intrinsèque s'initie par la fixation du Facteur XII sur des surfaces chargées négativement du sous-endothélium. Ce FXII s'auto-active (FXII → FXIIa) et active

le Facteur XI (FXI → FXIa). Ce dernier active à son tour le Facteur IX (FIX → FIXa). Le FIXa s'associe alors à son cofacteur, le FVIIIa en présence de calcium et de phosphatidylsérine (PS) des plaquettes activées pour former le complexe ténase. Ce dernier se lie alors à son substrat, le Facteur X pour l'activer (FX → FXa). Le FXa se trouve alors à la jonction des 2 voies d'activation et son importante génération entraîne la génération de thrombine. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine d'une part et active le Facteur XIII (FXIII → FXIIIa), aboutissant à la stabilisation du caillot de fibrine par le FXIIIa<sup>58</sup>. Par ailleurs, la génération de thrombine sert également d'activation de voies d'amplification puisque la thrombine active le FVIII, nous l'avons vu, mais également le FV ; tous deux nécessaires à sa propre production.



**Figure 4. Cascade de la coagulation.** L'exposition du facteur tissulaire (FT) et du collagène déclenche simultanément la voie extrinsèque et la voie intrinsèque de la cascade de la coagulation, respectivement. Le FT active le facteur VII (FVII → FVIIa) et se lie au FVIIa pour activer le facteur

X (FX → FXa). Le FXa génère de petites quantités de facteur V activé (FVa), permettant la génération précoce de thrombine en clivant la prothrombine. Cette thrombine clive le facteur VIII et l'active (FVIII → FVIIIa). En parallèle, le facteur XII s'auto-active au contact du sous-endothélium exposé (FXII → FXIIa) et active le facteur XI (FXI → FXIa). Ce dernier active le facteur IX (FIX → FIXa) qui s'associe au FVIIIa pour activer son substrat, le FX et générer de grandes quantités de thrombine. La thrombine transforme alors le fibrinogène en fibrine et active le facteur XIII (FXIII → FXIIIa) qui stabilise le caillot de fibrine.

### Catabolisme du FVIII

Le récepteur LRP1 (Lipoprotein receptor-related protein-1) ou CD91 est un récepteur d'endocytose connu pour son rôle de maintien de l'homéostasie, notamment du cholestérol<sup>59</sup>. Or, il s'avère que LRP1 reconnaît également le FVIII *in vitro* et permet sa dégradation intracellulaire<sup>60</sup>. Ainsi, *in vivo* une déficience en LRP1 se traduit par un temps de présence du FVIII dans le plasma 1,5 fois plus importante<sup>61</sup>. Selon le modèle proposé par Sarafanov et Saenko, le catabolisme du FVIII via LRP1 se ferait en deux étapes<sup>62,63</sup>. La première consiste en la fixation et l'accumulation de FVIII à la surface de la cellule après liaison entre son domaine A2 et des protéoglycanes héparanes sulfates (heparan sulfate proteoglycan - HSPG). A ce stade, le FVIII est complexé au vWF, qui se détache, révélant un site de liaison du LRP1 sur le domaine C2 du FVIII. C'est suite à cette reconnaissance du domaine C2 que le FVIII est endocyté et dégradé. Cette hypothèse est étayée *in vivo* par le fait que le blocage simultané des HSPG et de LRP1 aboutit à une augmentation de la demi-vie du FVIII de 5,5 fois.

Les études précédemment citées ont utilisé la molécule RAP pour inhiber LRP1 et démontrent une diminution plus importante du catabolisme que les modèles déficients en LRP1. Or, RAP n'est pas un antagoniste exclusif du LRP1, mais il inhibe l'ensemble des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein - LDL). On peut donc supposer que cette différence est due à l'intervention d'autres récepteurs aux LDL dans le catabolisme du FVIII. C'est ce qu'ont confirmé les travaux d'Ananyeva et al. *in vitro*<sup>64</sup> et ceux de Bovenschen et al. *in vivo*<sup>65</sup>.

Il semble par ailleurs que le FVIII soit également reconnu par ses motifs post-traductionnels. Ainsi, le domaine B du FVIII, très fortement N-glycosylé, est-il reconnu par l'Asialoglycoprotein Receptor (ASGPR), une lectine de type C<sup>66</sup>.



## II. Traitements de l'Hémophilie A et options thérapeutiques

### 1. Traitements actuels

#### *FVIII thérapeutiques*

A l'heure actuelle, le traitement des patients atteints d'hémophilie A consiste en l'injection intraveineuse de FVIII exogène afin de restaurer des taux suffisants de FVIII en circulation. L'administration de ce FVIII dit « thérapeutique » permet de prévenir et/ou de traiter les hémorragies, puisqu'elle se fait à la demande (à la suite d'un épisode hémorragique) mais surtout en prophylaxie (en prévention de l'apparition d'hémorragie).

Lorsqu'il est utilisé en prophylaxie, pour prévenir l'apparition de symptômes tels que l'arthropathie, le FVIII thérapeutique est injecté 2 à 3 fois par semaine à faible dose, soit 25 à 40 UI/kg<sup>67,68</sup>. En effet, l'objectif ici est de modifier le phénotype hémorragique de sévère à modéré, puisqu'il a été montré une protection contre les symptômes les plus lourds et donc une meilleure qualité de vie chez les patients hémophiles A modérés<sup>69,70</sup>. Cet effet protecteur contre les hémarthroses et autres saignements à 25 UI/kg a été confirmé chez des patients<sup>71</sup>. En revanche, l'adhésion du patient est critique pour obtenir une bonne observance du traitement, surtout chez les jeunes enfants, ce qui constitue une limite importante à cette stratégie et pose la question de l'âge de début de la prophylaxie<sup>72</sup>. En ce qui concerne la prise en charge à la demande, les protocoles sont plus variables selon l'intensité du saignement mais les taux de FVIII à atteindre sont beaucoup plus importants (40-100% d'activité normale du FVIII)<sup>67</sup>.

Dans les pays dits « développés », le FVIII thérapeutique provient de deux sources : dérivé de plasma (dérivés plasmatiques ou « plasma derived FVIII » - pdFVIII) ou issu du génie génétique (recombinant - rFVIII). Le pdFVIII est un FVIII précipité puis purifié par chromatographie à partir d'un mélange de plasma de donneurs sains<sup>73</sup>. Depuis les années 1980 et le scandale du sang contaminé, au cours duquel 60 à 70% des patients hémophiles ont été contaminés par le virus du SIDA (VIH) et celui de l'hépatite C (VHC), les pdFVIII subissent également des étapes d'inactivations virales et le risque infectieux à quasiment disparu<sup>74</sup>. Une attention particulière doit cependant être portée sur la transmission de maladies à prion comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob<sup>75</sup>. Par ailleurs, 98 à 99% des

protéines présentes dans les préparations de pdFVIII correspondent à d'autres protéines purifiées avec le FVIII telles que le vWF, l'albumine ou la fibronectine<sup>76</sup>. Cela pose problème quant à l'immunogénicité de ces préparations<sup>77</sup>. L'ensemble de ces limitations a favorisé l'essor de la production de FVIII recombinants. Ces FVIII sont synthétisés à partir de la séquence ADN de deux donneurs<sup>78</sup> et produits dans des lignées cellulaires de hamster. Baxter/Shire utilise des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) pour produire l'Advate<sup>®</sup>, tandis que Bayer et CSL-Behring utilisent des cellules BHK (Baby Hamster Kidney) pour le Kogenate<sup>®</sup> et l'Helixate<sup>®</sup>, respectivement. Plus récemment, la production de ce rFVIII a été optimisée par Wyeth/Pfizer en synthétisant un FVIII directement sans domaine B (B Domain Deleted FVIII - BDD FVIII), le Refacto<sup>®</sup> et Octapharma a produit son FVIII BDD, le Nuwiq<sup>®</sup> dans des cellules humaines, les HEK293 (Human Embryonic Kidney)<sup>79</sup>.

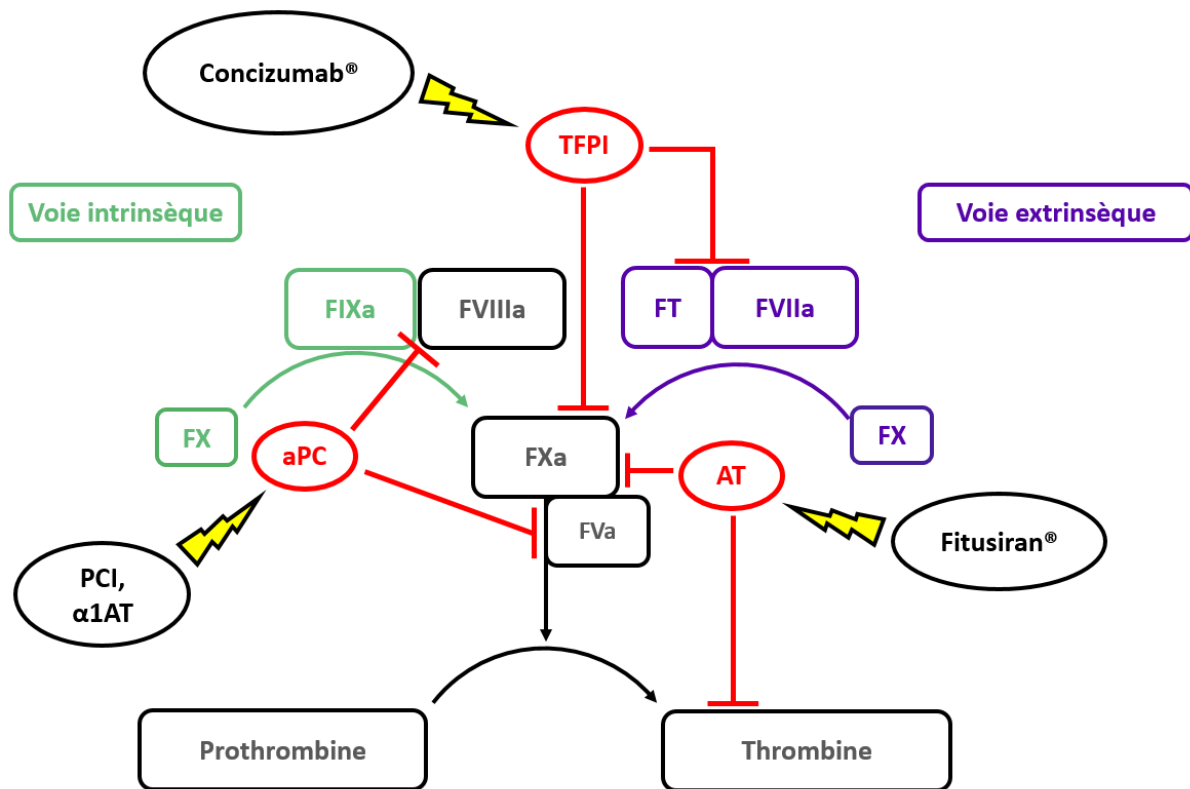
### Thérapies sans FVIII

Cependant, le FVIII, de par sa taille, reste difficile et donc coûteux à produire. C'est une des raisons pour laquelle d'autres axes de recherche alternatifs à l'utilisation de FVIII ont été développés.

Le premier d'entre eux vise à court-circuiter le FVIII dans la cascade de la coagulation (« by-passing agents »). On trouve ainsi l'utilisation de FVIIa, qui permet la génération de thrombine par la voie extrinsèque<sup>80</sup>, ou encore de concentrés de protéines du complexe prothrombinique activé (activated Prothrombin Complex Concentrates – aPCC)<sup>81</sup>. Les aPCC, dont le FEIBA<sup>®</sup> de Baxter est le seul commercialisé, comprennent toutes les enzymes et cofacteurs nécessaires à la génération de thrombine (prothrombine, FVIIa, le FIXa, le FXa...).

La deuxième stratégie se propose de rétablir la coagulation en inhibant les régulateurs naturels de celle-ci. Ainsi, la protéine C activée (activated protein C - aPC) inactive le FV et le FVIII<sup>57,82</sup>. C'est pourquoi plusieurs molécules comme l'inhibiteur de la protéine C (protein C inhibitor -PCI) et l' $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1AT) sont utilisées afin de favoriser la coagulation<sup>83,84</sup>. De façon similaire, la kinase Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) régule la coagulation en inhibant non seulement le FXa, mais également le complexe TF-FVIIa<sup>85</sup>. C'est pourquoi cette molécule a été choisie comme cible pour être inhibée par un

anticorps monoclonal, le Concizumab<sup>®86</sup>. Cet anticorps inhibe la liaison du TFPI au FXa et empêche également l'inhibition du complexe FT-FVIIa, permettant ainsi le rétablissement de la coagulation<sup>87,88</sup>. L'antithrombine (AT) elle, exerce son effet anticoagulant en inhibant la thrombine et dans une moindre mesure le FIXa<sup>89</sup>. Ainsi, le Fitusiran<sup>®</sup>, un petit ARN interférant (small interfering RNA – siRNA) développé par Alnylam, inhibe la traduction de l'ARNm codant l'AT et favorise donc la coagulation<sup>90</sup>.



**Figure 5. Régulateurs naturels de la cascade de la coagulation et stratégies pour les inhiber.** La kinase Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) inhibe le FXa et le complexe FT-FVIIa. Le Concizumab<sup>®</sup> est un anticorps anti-TFPI monoclonal thérapeutique qui inhibe la liaison du TFPI à ces cibles. De même, l'antithrombine (AT) inhibe le complexe FT-FVIIa et dans une moindre mesure le FXa. Le Fitusiran<sup>®</sup> est un petit ARN interférant qui inhibe la synthèse de l'AT. Enfin, la protéine C activée (aPC) inactive le FVa et le FVIIIa. L'inhibiteur de la protéine C (PCI) et l'α1-antitrypsin (α1AT) inhibent l'action de l'aPC.

## 2. Nouvelles stratégies

Si les patients hémophiles sont à 87% « satisfaits / plutôt satisfaits » de leur traitement actuel, 55% d'entre eux espèrent que les nouveaux traitements leur permettront de diminuer la fréquence des injections<sup>91</sup>. Cette étude, menée sur plus de 1 000 patients

hémophiles (dont 85 % atteints d'hémophilie A) entre janvier 2015 et août 2016 est très intéressante car elle compile les attentes des patients quant aux futurs traitements. Il en ressort que ces attentes se regroupent en deux catégories : tout d'abord la qualité de vie (fréquence d'injection, problème d'accès aux veines, stockage, flexibilité de gestion du traitement...) et ensuite la sécurité du traitement (absence d'effets secondaires, peur de l'apparition d'une réponse immunitaire...). A noter que cette étude a été faite en Allemagne, Suisse et Autriche, pays où l'accès aux centres de soins et aux traitements n'est pas représentatif de la situation mondiale. Cela explique probablement que la baisse du prix du traitement, bien qu'estimé à plus de 50 000€/an/patient<sup>92,93</sup>, ne constitue une attente que pour 5% des patients interrogés.

#### *FVIII à longue durée de vie*

En réponse à ces attentes et ainsi augmenter l'adhésion aux traitements, de nouveaux traitements ont été développés. La première évolution a été la mise sur le marché de FVIII à longue durée de vie afin de diminuer la fréquence des injections et de protéger les articulations des patients en favorisant une présence constante de FVIII dans le sang. Pour augmenter la demi-vie du FVIII, deux stratégies sont actuellement utilisées. La première d'entre elles consiste à fusionner la région constante (partie Fc) de l'IgG humaine à l'extrémité C-terminale du FVIII. Les IgG circulent en effet pendant environ 3 semaines dans le corps, notamment grâce à leur liaison au récepteur Fc néonatal (FcRn) qui les protège de la dégradation lysosomale<sup>94</sup>. La fusion de la partie Fc vise donc à utiliser ce processus biologique afin de préserver le FVIII de la dégradation et ainsi augmenter sa demi-vie. Ainsi, l'Eloctate® développé par Bioverativ montre-t-il une demi-vie 1,5 fois plus longue qu'un BDD normal<sup>95</sup>. Ce produit a d'ailleurs fait l'objet d'un essai clinique de phase III (Numéro ClinicalTrials.gov : NCT01454739) qui semble valider son effet et son innocuité à long terme<sup>96</sup>.

La seconde stratégie pour allonger la demi-vie du FVIII thérapeutique repose sur sa PEGylation, qui consiste en la liaison au FVIII de polymères de polyéthylène glycol (PEG). Cette PEGylation permet d'une part d'augmenter la taille des molécules thérapeutiques et ainsi diminuer la clairance rénale, et d'autre part de les protéger des protéases et de l'endocytose par les cellules « scavenger » comme les macrophages ou les cellules

endothéliales<sup>97</sup>. Cela résulte donc en une augmentation de la demi-vie, de 1,6 fois dans le cas du FVIII<sup>98</sup>. A nouveau, des essais cliniques de l'Adinovate® de Shire (Numéro ClinicalTrials.gov : NCT01736475) ou du N8-GP de NovoNordisk ont confirmé l'allongement de la demi-vie et la sureté des produits<sup>99</sup>.

Par ailleurs, d'autres stratégies sont actuellement en développement pour augmenter la demi-vie du FVIII, comme par exemple la synthèse d'un FVIII monocaténaire (single-chain FVIII – scFVIII) avec une affinité environ deux fois supérieure pour le vWF que le FVIII, *in vivo*<sup>100</sup>. Cependant, l'amélioration de demi-vie obtenue est pour l'instant plus faible qu'avec les stratégies précédemment citées, puisqu'elle est de l'ordre de 1,2 fois<sup>101</sup>.

Certaines de ces stratégies ont également été utilisées pour prolonger la demi-vie du FIX et permettent une augmentation de 4 à 6 fois de sa demi-vie. L'écart observé entre le gain pour le FVIII et le FIX s'explique par le fait que le catabolisme du FVIII est grandement régulé par son interaction avec sa protéine chaperonne. Nous l'avons vu, en l'absence de vWF, la demi-vie du FVIII est presque 6 fois plus courte. Ainsi, le facteur limitant l'augmentation de la demi-vie du FVIII est la demi-vie du vWF (approximativement 15h). Le FVIII, qu'il ait une demi-vie prolongée ou pas, est dégradé en étant complexé avec le vWF. A l'inverse, le FIX n'a pas cette limitation et lors d'un essai clinique en 2014, il a par exemple été calculé pour le FIX-Fc, une demi-vie de 82h, soit 5 fois supérieure à celle du FIX<sup>102-104</sup>.

**FVIII à longue durée de vie**

Stratégie	Produit (compagnie)	Demi-vie (h)	Statut actuel
rFVIII-Fc	Eloctat® / Eloctate® (Biogen Idec / Sobi)	19	Commercialisé aux USA, au Canada et en Europe
PEGylation aléatoire	Adynovate® - BAX 855 (Baxalta, Shire)	14-16	Commercialisé aux USA, au Japon et en Suisse
PEGylation site spécifique	Turoctocog Alfa Pegol - N8-GP (Novo Nordisk)	19	Extension d'essai clinique
PEGylation site spécifique	BAY 94-9027 (Bayer)	19	Extension d'essai clinique
FVIII monocaténaire	Afstyla® - Ionoctocog alfa (CSL-Behring)	-	Commercialisé aux USA

**Essais cliniques avec des FVIII à longue durée de vie**

Stratégie	Programme d'essai (N° clinicaltrials.gov)	Nb de patients	Protocoles
rFVIII-Fc	A-LONG (NCT01181128)	165 > 12 ans	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10-65 UI/kg</li> <li>• Prophylaxie ou à la demande</li> </ul>
PEGylation aléatoire (Adynovate®)	PROLONG-ATE (NCT01736475)	159 > 12 ans	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prophylaxie ou à la demande</li> </ul>
PEGylation site spécifique (Turoctocog Alfa Pegol)	Pathfinder™ 6 (NCT02137850)	125 < 6 ans	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20-75 UI/kg</li> <li>• Prophylaxie ou à la demande</li> </ul>
FVIII monocaténaire (CSL627)	A Phase III Open Label (NCT02172950)	250	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTPs vs PUPs</li> <li>• Prophylaxie ou à la demande</li> </ul>

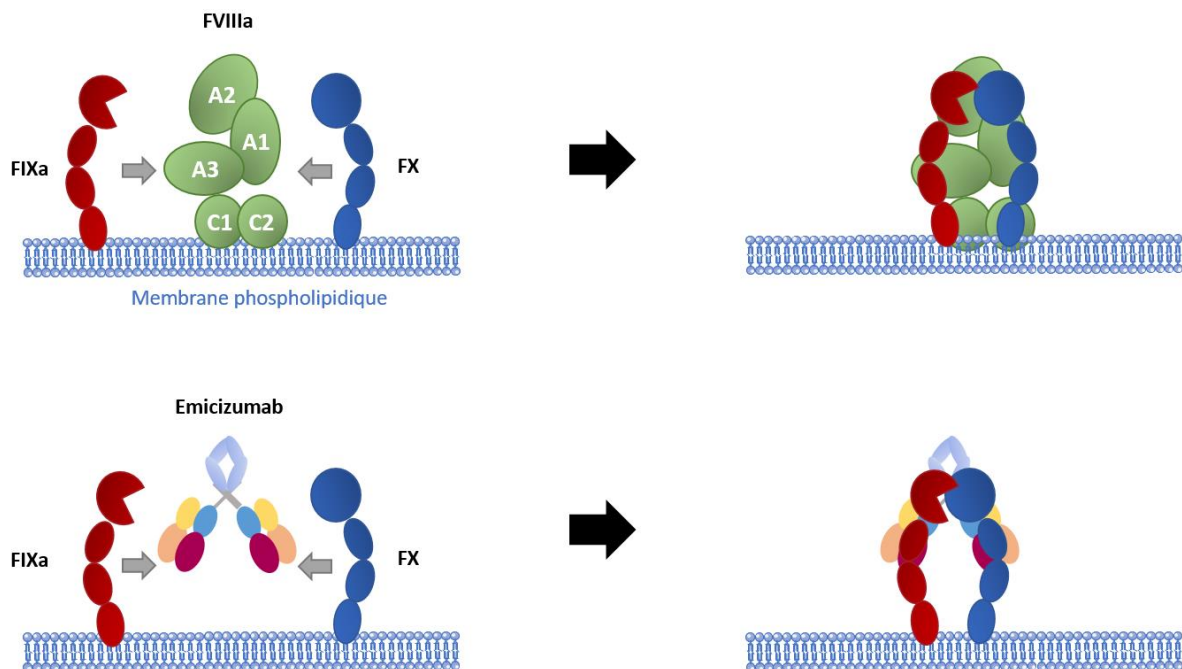
**Figure 6. FVIII à longue durée de vie et essais cliniques correspondants.** D'après Mancuso et Santagostino, J. Clin. Med., 2017

*Emicizumab*

Une nouvelle molécule est, elle, déjà approuvée par l'agence américaine en charge des médicaments (Food and Drugs Administration – FDA) sous le nom d'Hemlibra® (Roche)<sup>105</sup>. Cette molécule, l'Emicizumab, remplace le FVIII sans pour autant être du FVIII. Il s'agit en effet d'un anticorps bispécifique, qui reconnaît avec l'un de ses fragments de liaison à l'antigène (antigen-binding fragment – fab) le FIXa et avec le second fab, le FX<sup>106</sup>. Cette double reconnaissance permet le rapprochement spatial des deux molécules, permettant ainsi à l'enzyme (le FIXa) d'activer son substrat (le FX) sans l'intervention de FVIII<sup>107</sup>. Le premier essai clinique mené chez l'homme a montré une demi-vie de 4 à 5 semaines après une injection sous-cutanée d'Emicizumab<sup>108</sup>. Les essais cliniques suivants ont par la suite démontré une forte diminution du nombre de saignements annuels (Annual Bleeding Rate – ABR), voire une disparition totale des saignements chez plus de 70% des patients<sup>109</sup>. Un programme d'essais cliniques nommé HAVEN a depuis vu le jour et les 4 essais cliniques qu'il comprend confirment une correction du phénotype hémorragique, particulièrement lorsqu'il est donné en prophylaxie<sup>110</sup>. Cependant, des micro-angiopathies thrombotiques ont été décrites chez certains patients traités en parallèle avec des aPCC. Cela est probablement dû au fait que les aPCC contiennent du

FIXa et du FX, comme décrit précédemment (paragraphe « Thérapies sans FVIII »), élément essentiel de l'action de l'Emicizumab et entraînant donc des symptômes thrombotiques<sup>111</sup>. Ainsi, il est recommandé d'éviter de traiter les patients avec des aPCC lorsqu'ils utilisent l'Emicizumab en prophylaxie. Il est plutôt conseillé de privilégier du FVIIa pour lequel aucune thrombose n'a été décrite<sup>112</sup>.

Par ailleurs, la particularité de cette très élégante stratégie requiert une attention particulière quant à son monitoring. En effet, l'Emicizumab est très différent d'un point de vue moléculaire du FVIII qu'il remplace et cela entraîne un grand nombre de conséquences. En plus des sites de fixation et de la spécificité qui sont différents entre les deux molécules, la pharmacocinétique varie également beaucoup. Ainsi, si les niveaux d'Emicizumab dans le plasma sont estimés comme équivalents à 10 à 15% de l'activité hémostatique normale du FVIII<sup>113</sup>, la plus faible affinité de l'anticorps bispécifique pour ses ligands entraîne la formation de moins de complexe ténase que pour une concentration en FVIII équivalente<sup>114</sup>. Enfin, le FVIII nécessite une activation préalable pour jouer son rôle de cofacteur et peut être inactivé (par l'aPC notamment) alors que l'Emicizumab n'est sensible à aucun de ces mécanismes de régulation.



**Figure 7. Schéma du mode d'action du FVIIIa ou de l'Emicizumab.** La double reconnaissance du FIXa et du FX permet le rapprochement physique de l'enzyme et du substrat, permettant une activation du FX en FXa. D'après Kitazawa, Nat. Med., 2012.

### Thérapie génique

Enfin, la troisième stratégie a pour objectif de guérir l'hémophilie A. Il s'agit de la thérapie génique. Cette stratégie vise à incorporer dans les cellules du patient une version saine du gène provoquant la maladie, permettant théoriquement une cure du patient. Le caractère monogénique de l'hémophilie (causée par un seul gène) et le fait qu'une faible augmentation de l'activité pro-coagulante permette une nette amélioration du phénotype hémorragique font de l'hémophilie un candidat idéal à la thérapie génique, comme en témoignent les avancées majeures obtenues pour l'hémophilie B<sup>115,116</sup>. En ce qui concerne l'hémophilie A, les contraintes sont plus importantes puisqu'il se rajoute, aux difficultés intrinsèques à la thérapie génique (expression du transgène, immunogénicité...), la très grande taille du gène *F8* et de son transcrit. Les éléments essentiels à prendre en compte sont donc : le vecteur utilisé, le tissu cible et le gène du FVIII.

Ainsi la recherche sur les vecteurs viraux nécessaires au transport du gène et à son intégration, a-t-elle été fondamentale au développement de la thérapie génique pour l'hémophilie A. Les vecteurs sont des acides nucléiques viraux (ADN ou ARN) qui sont utilisés pour tirer avantage de la capacité naturelle des virus à infecter une cellule cible et à utiliser la machinerie cellulaire pour leur propre réplique. Ainsi, les vecteurs les plus couramment utilisés sont les lentivirus (génomome à ARN) et les AAV (Adeno-Associated Virus, génomome à ADN). Si les lentivirus semblent plus adaptés pour l'hémophilie A car de plus grands gènes peuvent y être insérés<sup>117</sup>, les AAV ont l'avantage d'être moins immunogènes et non intégratifs, limitant ainsi le risque de mutation intégrationnelle<sup>118</sup>. En effet, l'immunogénicité et la toxicité (des vecteurs, de la protéine synthétisée) représentent de grandes contraintes en thérapie génique. C'est pourquoi des AAV recombinants ont été développés à partir des nombreux sérotypes existants naturellement, offrant ainsi aux chercheurs une boîte à outils d'AAV très diverse<sup>119</sup>. Par ailleurs, les différents AAV présentent des tropismes pour certains organes et vont donc permettre une expression préférentiellement dans ceux-ci<sup>120</sup>.

C'est également par le choix du promoteur du gène d'intérêt que l'on peut cibler un organe. En effet, le choix du promoteur et de ses caractéristiques est une étape essentielle du développement d'une thérapie génique. Un promoteur peut être choisi pour sa



spécificité d'expression (exprimé dans un certain type cellulaire ou tissu) ou pour sa « force » (sa capacité à promouvoir l'expression du gène qui le suit).

En parallèle, le gène du FVIII a lui aussi subi un grand nombre d'améliorations. Non seulement pour en diminuer la taille (utilisation d'un gène codant un FVIII BDD), mais également pour augmenter son taux de synthèse par exemple en faisant de la codon-optimisation. La codon-optimisation consiste en effet à choisir les codons pour lesquels les ARN de transfert (ARNt) sont les plus fréquents chez l'hôte et ainsi permettre une augmentation du taux de traduction<sup>121</sup>.

L'ensemble de ces développements a permis le lancement de plusieurs essais cliniques qui n'ont pas permis d'aboutir à une correction phénotypique à long terme<sup>121</sup>. Cependant, un nouvel essai clinique de thérapie génique a été lancé en août 2015 (Numéro ClinicalTrials.gov : NCT02576795). Cet essai de phases I/II vise à évaluer l'efficacité du Valoctogène Roxaparvovec® (BMN 270 - Biomarin Pharmaceutical Inc.), une thérapie AAV5 codant pour un FVIII BDD codon-optimisé, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du foie<sup>122</sup>. Si les résultats finals sont attendus pour 2022, des résultats préliminaires sont déjà parus. Parmi les 7 patients traités avec la plus forte dose (6.10<sup>13</sup> vg/kg), 5 ont des taux de FVIII entre 8 et 60% de l'activité normale, entre 5 et 16 semaines post-injection<sup>123</sup>. Après 20 semaines, les taux de FVIII sont supérieurs à 50% pour tous les patients sauf un (entre 12 et 32%). Par ailleurs, il a été constaté une augmentation de la cytotoxicité hépatique (via les taux d'Aspartate AminoTransférase -ASAT- et d'Alanine AminoTransférase -ALAT-) chez 8 patients sur les 9 compris dans l'essai clinique. Cependant, chez un patient seulement, l'augmentation d'ALAT s'est accompagnée d'une diminution de l'activité du FVIII, ce qui a été résolu par l'utilisation de glucocorticoïdes<sup>124</sup>. Depuis, d'autres essais cliniques ont été lancés et on en dénombre aujourd'hui sept autres en phase de recrutement (www.clinicaltrials.gov, recherche « hemophilia A » + « gene therapy »).

Cependant, ces essais cliniques risquent de se confronter à la préexistence, chez 15 à 20% de la population, d'anticorps anti-AAV<sup>125</sup> à des doses qui, bien que faibles, bloquent complètement la transduction des AAV<sup>126</sup>. Chez les patients hémophiles, ces titres d'anticorps sont encore plus élevés et atteignent 43,5% des patients pour certains sérotypes<sup>127</sup>. En effet, il a été montré que des cellules de l'immunité innée reconnaissent l'ADN des AAV, déclenchant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, étant

donné la forte homologie entre les différents sérotypes, tous sont reconnus, inégalement, par ces anticorps. Dans l'essai clinique cité précédemment, des anticorps anti-AAV ont d'ailleurs été détectés chez tous les participants dès la huitième semaine post-injection<sup>124</sup>. De nombreuses stratégies pour surmonter cette difficulté sont imaginées, notamment l'utilisation d'immunosuppresseurs, mais toutes présentent des inconvénients<sup>126</sup>. La thérapie génique est donc, dans le cadre de l'hémophilie A, très prometteuse, sans pour autant pouvoir proposer une solution à court terme pour l'ensemble des patients.

**Le premier projet de cette thèse vise à tester une nouvelle stratégie thérapeutique intermédiaire entre la thérapie substitutive et la thérapie génique. Cette stratégie repose sur l'injection d'ARNm codant le FVIII.**

### III. Complication du traitement

#### 1. Immunogénicité du FVIII thérapeutique

Lors d'un traitement de substitution avec du FVIII, la complication la plus redoutée à l'heure actuelle est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII. En effet, chez 25 à 30% des patients hémophiles A sévères traités avec du FVIII thérapeutique, on constate l'apparition d'anticorps anti-FVIII qui inhibent son activité pro-coagulante et sont donc appelés « inhibiteurs »<sup>128-130</sup>. Le traitement perd alors son efficacité et les patients font face à une impasse thérapeutique. Il est intéressant de noter que l'on constate également le développement d'inhibiteurs chez 7% des patients atteints d'une hémophilie A non sévère après 50 jours d'exposition<sup>131</sup>.

L'apparition d'inhibiteurs est donc redoutée par les cliniciens car elle représente, nous l'avons vu, une impasse thérapeutique, mais elle constitue aussi la 3<sup>e</sup> préoccupation majeure des patients<sup>91</sup>. En effet, en plus de voir leur qualité de vie se dégrader, leur taux de mortalité a longtemps augmenté, allant jusqu'à doubler avant 1992<sup>132</sup>. Aujourd'hui, si le taux de morbidité est toujours augmenté, l'apparition d'inhibiteurs ne semble plus significativement augmenter la mortalité. Cela se fait cependant au prix d'un triplement du coût de prise en charge, avec un coût en 2003 dépassant les 200 000 euros par an et par patient<sup>92</sup>.

L'identification des facteurs et la compréhension des mécanismes menant à l'apparition d'inhibiteurs est indispensable pour, à terme, améliorer la qualité de vie des patients hémophiles. Ainsi, de nombreuses études ont été menées pour identifier de potentiels facteurs prédictifs et tenter de prévenir l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII. Ces facteurs ont été classés en deux catégories : les facteurs liés aux patients (intrinsèques) et ceux indépendants des patients (environnementaux).

## 2. Facteurs de risques intrinsèques aux patients

Le fait que de si nombreuses mutations du gène codant le FVIII aient été décrites peut s'expliquer par la localisation du gène *F8*. Celui-ci se situe dans une région constituée de nombreuses séquences répétées, ce qui se traduit par un important taux de mutations ( $3,4 \cdot 10^{-5}$  mutations/division cellulaire pour *F8* vs  $1 \cdot 10^{-6}$  mutations/gène/division cellulaire en moyenne)<sup>133</sup>. Ainsi, le facteur génétique apparaît comme évident, d'autant plus si l'on considère que les patients avec un antécédent familial d'inhibiteurs ont trois fois plus de risque d'en développer également<sup>134</sup>.

### Anomalies du gène codant le FVIII

Le type de mutation responsable de l'hémophilie A a été identifié comme facteur de risque. Les patients ayant une large délétion du gène *F8* ou une mutation non-sens ont plus de risque de développer des inhibiteurs que ceux porteurs d'une inversion de l'intron 22<sup>22</sup>. De même, les patients hémophiles A sévères sont 6 fois plus nombreux (30% vs 5%) que les hémophiles A modérés à développer des inhibiteurs<sup>135</sup>. Cependant, il existe des patients dits « CRM négatifs » (Cross-Reacting Material) qui n'ont pas d'antigène FVIII détectable dans le plasma. On pourrait alors s'attendre à ce que la tolérance centrale au FVIII soit impossible et que pour le système immunitaire de ces patients le FVIII thérapeutique soit considéré comme du non-Soi et qu'ils déclenchent donc systématiquement une réponse immunitaire. Or, tous ne le font pas avec, par exemple, seulement environ 20% de patients avec une inversion de l'intron 22 qui développent des inhibiteurs, malgré leur phénotype CRM-négatif<sup>136</sup>. Ce genre d'observation amène à penser que si la mutation du gène *F8* est très importante, voire prépondérante dans le développement d'inhibiteurs, elle est néanmoins insuffisante à l'expliquer<sup>137</sup>.

### Autres gènes

Des études chez le patient ont permis d'identifier certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) nommés HLA (human leukocyte antigen) comme facteur de risque<sup>138,139</sup>. Ces observations ont par la suite été confirmées *in silico*<sup>140,141</sup> et pourraient signifier que certains patients CRM négatifs synthétisent des parties du FVIII qui sont capables d'engendrer un complexe CMH-peptide suffisamment stable pour induire une tolérance centrale.

Parallèlement, de nombreux autres polymorphismes ont été décrits comme ayant un rôle dans le développement ou la protection contre les inhibiteurs. Il s'agit de polymorphismes dans des gènes codant pour des protéines de l'immunité. On trouve notamment des gènes codant des interleukines (IL), telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2 ou l'IL-12<sup>142</sup>. Cependant, l'identification de facteurs de risque/de protection se heurte aux faibles effectifs des cohortes de patients hémophiles A et d'autres études nuancent ces résultats<sup>134,143</sup>. Mais le polymorphisme le plus couramment décrit est celui dans le promoteur du gène codant l'IL-10<sup>137,144</sup>. Cela peut s'expliquer par le fait que l'IL-10 est un médiateur immunitaire crucial, notamment pour la prolifération des lymphocytes T (LT) régulateurs (Treg), cellules essentielles à la régulation de la réponse immunitaire<sup>145</sup>. Des polymorphismes dans les promoteurs des gènes codant pour le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) et l'hème oxygénase (HOX-1) ont également été identifiés<sup>146-148</sup>. Enfin, il a été récemment montré que le groupe sanguin O est associé à une diminution du risque d'approximativement deux fois, bien que les raisons de cette protection restent peu claires<sup>149</sup>.

### Ethnie

D'autres facteurs liés au patient ont également été décrits. Parmi eux, l'ethnie d'origine joue un rôle dans la probabilité de développer des inhibiteurs. En effet, il semble que les patients non caucasiens (hispaniques, africains, asiatiques, indiens) aient jusqu'à 5 fois plus de risque de développer des inhibiteurs<sup>150-154</sup>. Cela peut être relié aux séquences ADN (de deux donneurs caucasiens) à partir desquelles les FVIII recombinants ont été clonés<sup>155</sup>, ou à la différente répartition des allèles HLA selon les ethnies. Cependant, cette variable nécessite d'autres études pour être confirmée comme un facteur de risque.

### 3. Autres facteurs de risques

Si l'étude de cohortes et de familles avec un historique d'inhibiteurs a permis de confirmer la forte implication de l'aspect génétique, seule la mutation de *F8* ou les antécédents semblent systématiquement déterminants quant à l'apparition d'inhibiteurs. Ainsi, il semble clair désormais que l'apparition de ces anticorps est liée à une interaction complexe entre des facteurs intrinsèques au patient et à des facteurs qui lui sont externes. Ces facteurs regroupent l'ensemble des variables reliées au traitement du patient. C'est pourquoi ils sont d'autant plus importants et intéressants, puisqu'ils représentent le levier permettant aux cliniciens d'agir afin de diminuer la probabilité d'apparition des inhibiteurs.

#### Antécédent de traitement

La première chose à prendre en compte pour monter des études sur les facteurs de risque indépendants du patient est de distinguer ceux ayant déjà reçu du FVIII (previously treated patients – PTPs) ou pas (previously untreated patients – PUPs). En effet, il a été montré que les PUPs ont une incidence d'inhibiteurs 30 fois plus importante que les PTPs<sup>156</sup>. De plus, les études menées sur les PUPs permettent d'éviter les biais liés aux traitements précédents. C'est pourquoi ce groupe de patients est le plus utilisé pour ces analyses<sup>157</sup>.

#### Le FVIII lui-même

La molécule de FVIII elle-même est une source d'immunogénicité. En effet, les mécanismes d'endocytose seront détaillés plus loin, mais la reconnaissance du FVIII par les cellules immunitaires est un élément primordial dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Des motifs comme les glycanes se terminant par des mannoses, ont été identifiés comme essentiels à la reconnaissance des pathogènes, notamment microbiens. Dans le cadre du FVIII, la présence d'un glycan se terminant par du mannose en position 2118 a été montrée comme favorisant l'endocytose du FVIII par des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MO-DC) via le récepteur CD206 *in vitro*<sup>158,159</sup>. De même, il a été montré par co-incubation avec des anticorps, puis mutation des résidus ciblés par

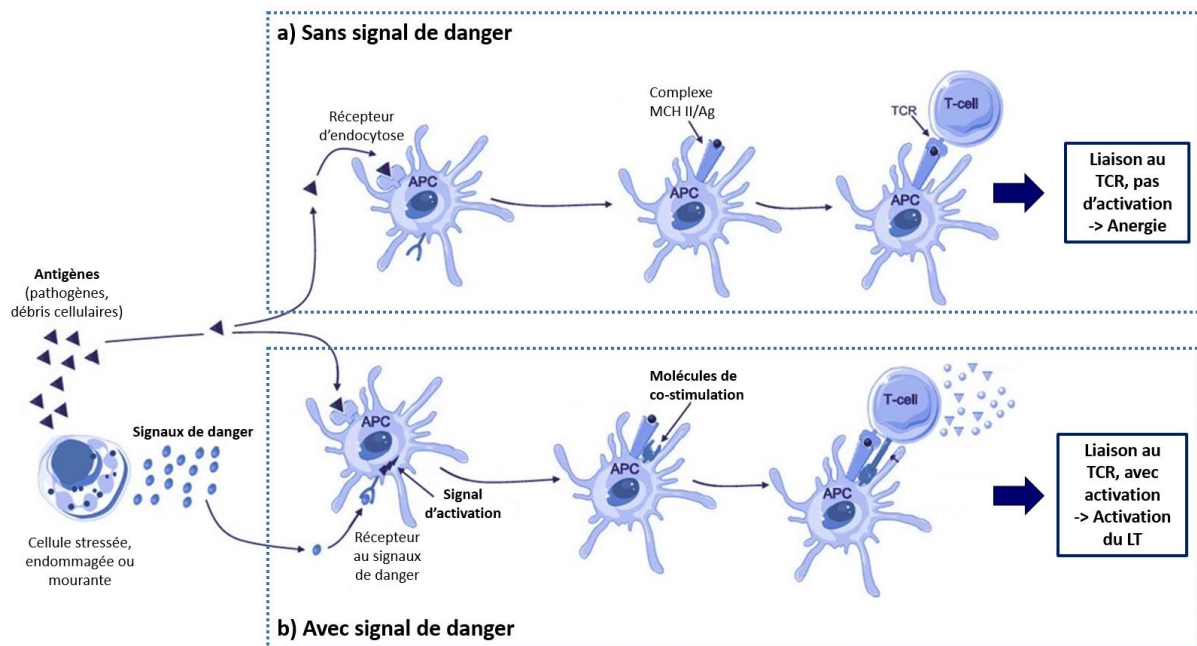
ces anticorps, que certains domaines du FVIII favorisent sa reconnaissance. En effet, *in vitro* certains résidus hydrophobes du domaine C2 favorisent son endocytose et la présentation aux LT<sup>160</sup>. *In vivo*, le domaine C1 joue également un rôle dans l'immunogénicité du FVIII puisque la triple mutation R2090A/K2092A/F2093A réduit l'activation des LT spécifiques du FVIII<sup>161,162</sup>.

Plusieurs études ont montré que la structure du FVIII ne permettait pas une maturation des cellules dendritiques, impliquées dans le déclenchement des réponses immunitaires<sup>163,164</sup>. Dès lors, outre la structure du FVIII, sa fonction a également été évoquée comme facteur de risque. Il a ainsi été proposé que la génération de thrombine induite après injection de FVIII thérapeutique puisse constituer un signal de co-stimulation qui, ajouté à une reconnaissance du FVIII par les cellules immunitaires, engendre le développement de la réponse immunitaire<sup>165</sup>. Cependant, une autre étude visant à étudier l'influence de l'explosion de génération de thrombine sur le développement d'inhibiteurs a remis en cause ces résultats. En effet, dans cette étude, ni l'injection d'un FVIII sans activité, ni le blocage du FT, ni le blocage de l'ensemble de la coagulation par la warfarine (un anticoagulant déplaçant la vitamine K) n'ont permis de voir une différence dans le développement d'inhibiteurs chez ma souris<sup>166</sup>.

#### Intensité du traitement

Si certaines études montrent que l'âge au moment de la première injection de FVIII peut constituer un facteur de risque, cela reste à confirmer. En effet, la majorité des études sont rétrospectives et se fondent sur l'âge de la première détection d'inhibiteurs, qui peut différer du moment de leur apparition. De plus, d'autres études semblent contredire ces résultats<sup>167</sup>. En revanche, une étude s'attachant à l'intensité du premier traitement (dose de FVIII) sur le développement d'inhibiteurs a été publiée en 2007. Cette étude rétrospective sur 366 PUPs a conclu notamment que le lien entre le bas âge lors de la première injection et le développement d'inhibiteurs décrit parfois, est probablement surtout dépendant de la dose de FVIII injecté<sup>168</sup>. Ces résultats confirment une observation similaire faite chez des patients hémophiles A modérés<sup>169</sup> et ont depuis été confirmés chez des hémophiles A sévères<sup>170</sup>. Cela peut être relié à la « théorie du danger » développée par Matzinger<sup>171,172</sup>, selon laquelle la réponse immunitaire ne se déclenche qu'en

présence de signaux de danger, en plus de l'antigène. Cette théorie est supportée par l'observation que l'injection de protéines exogènes ne permet pas systématiquement le déclenchement d'une réponse immunitaire, et nécessite parfois un adjuvant, source de ces signaux de danger. Ainsi, les patients ayant le plus d'évènements hémorragiques aigus sont ceux qui reçoivent des fortes doses de FVIII thérapeutiques (en péri-opératoire par exemple) et sont également les plus susceptibles de développer de l'inflammation (suite à l'opération pour traiter le saignement aigu). Cette inflammation constituerait alors un signal de danger, propice au développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII et donc d'inhibiteurs<sup>173</sup>. Cela est cohérent avec l'observation selon laquelle les patients atteints d'hémophilie A ont un statut plus pro-inflammatoire que des sujets sains<sup>174</sup>.



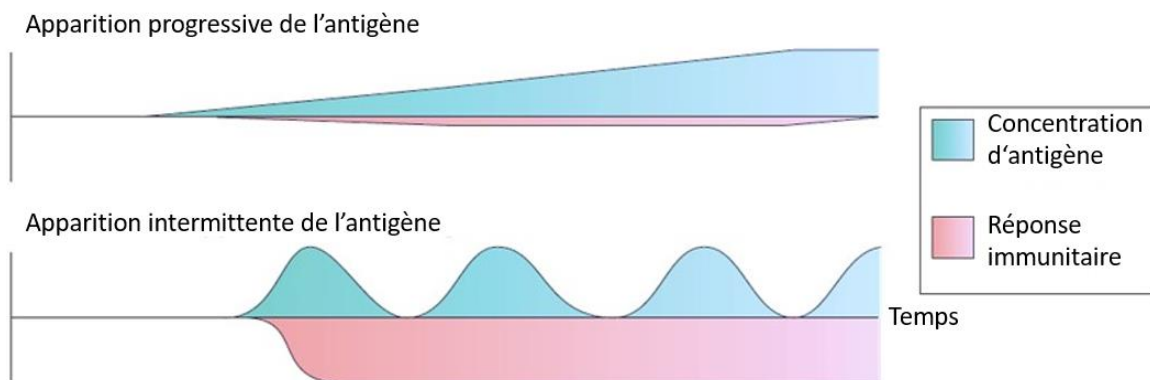
**Figure 8. Représentation schématique de la théorie du danger.** Lorsqu'un antigène (triangle) est reconnu par une cellule présentatrice d'antigène (APC) sans signal de danger (schéma du haut), la présentation des peptides au LT (T-cell) mène à son anergie. Lorsqu'un signal de danger (rond) est également fixé par l'APC en plus de l'antigène (schéma du bas), la présentation au LT mène à son activation. D'après Lövgren, Haemophilia, 2016.

Traitement prophylactique ou à la demande

D'autres études ont confirmé une augmentation du risque d'inhibiteurs de 2,5 fois en cas d'utilisation de fortes doses de FVIII (> 35 UI/kg)<sup>152</sup>.

Ces mêmes études ont également comparé l'utilisation de FVIII thérapeutique en prophylaxie ou à la demande. S'il a été montré que le traitement prophylactique diminue

le risque d'apparition des inhibiteurs de 60%<sup>167,168,175,176</sup>, les 20 premiers jours de traitement sont néanmoins autant à risque que lors du traitement à la demande<sup>177</sup>. Ces observations concordent avec la théorie de la discontinuité développée par Pradeu en 2013<sup>178</sup>. Cette théorie immunologique est fondée sur l'observation des cellules Natural Killer (NK). Ces cellules réagissent à l'absence d'un récepteur constitutivement présent (le CMH de classe I). Ainsi, lorsque ce récepteur disparaît, les cellules NK s'activent et détruisent la cellule cible. En revanche, en cas d'absence chronique du CMH I, les cellules NK s'adaptent et ne s'activent plus. Ainsi Pradeu conclut-il que les cellules NK détectent plutôt le changement d'expression du CMH I que sa présence ou son absence. En généralisant cette observation, notamment aux macrophages, il en conclut que la réponse immunitaire est induite par la présence discontinue de l'antigène au cours du temps. L'immunogénicité est donc ici définie comme la discontinuité antigénique et n'est plus exclusivement une propriété intrinsèque d'une molécule.



**Figure 9. Représentation schématique de la théorie de la discontinuité de l'antigène.** Lorsque la concentration en antigène (bleu) augmente au cours du temps sans discontinuité (schéma du haut), une tolérance à l'antigène pourrait se développer, inhibant l'apparition d'une réponse immunitaire (rose). En revanche, la présence discontinue de l'antigène (schéma du bas) induirait l'apparition d'une réponse immunitaire. D'après Pradeu, Nat. Rev. Immunol., 2013.

En appliquant cette théorie au traitement des patients hémophiles A sévères, le panneau du haut de cette figure représente l'injection d'une faible dose de FVIII à long terme, mimant le traitement prophylactique. Il en résulte une faible réponse immunitaire puis une tolérance au FVIII thérapeutique se développe. A contrario, le panneau du bas représente l'injection ponctuelle d'une forte dose de FVIII, comme lors d'un traitement à

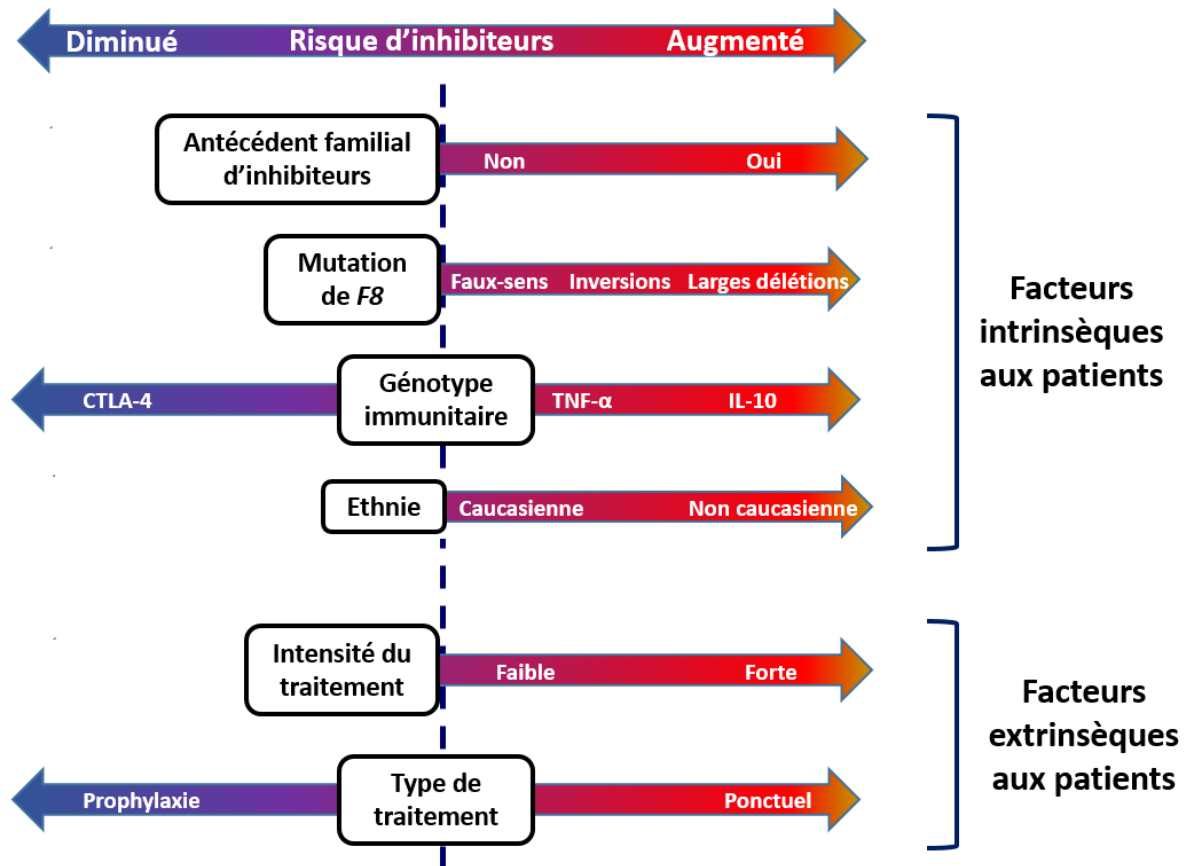


la demande. Selon la théorie de la discontinuité, cela aboutit à une très forte et durable réponse immunitaire, avec pour conséquence la synthèse d'inhibiteurs.

Cependant, un essai clinique nommé EPIC (Early Prophylaxis Immunologic Challenge), lancé en 2011 et visant à évaluer l'effet de la prophylaxie dans un contexte sans signaux de danger, sur le développement d'inhibiteurs a dû être arrêté prématurément suite à l'apparition d'inhibiteurs chez plus de 40% des patients<sup>179</sup>.

### Changement de produit

Enfin, la dernière variable liée au traitement est la source du FVIII thérapeutique. En effet, l'influence du pdFVIII ou du rFVIII quant à l'apparition d'inhibiteurs est l'un des débats les plus récurrents dans la communauté scientifique<sup>180,181</sup>. En 2003, une revue systématique de la littérature montre que l'incidence des inhibiteurs est multipliée par 2,5 chez les patients traités avec du rFVIII comparé à ceux traités avec du pdFVIII<sup>182</sup>. Bien que cela ait été confirmé quelques années plus tard<sup>183</sup>, les études regroupées dans cette revue sont très hétérogènes et donc difficilement comparables. Malgré tout, en 2010, une autre revue systématique sur plus de 2 000 PUPs confirme ces résultats avec une augmentation de presque 2 fois dans le cas du rFVIII<sup>184</sup>. Mais une fois que les 24 études prises en compte dans cette étude sont homogénéisées (conception et durée de l'étude, fréquence de détection des inhibiteurs...), la différence s'atténue<sup>185</sup>. Une nouvelle revue de 25 études prospectives pour un total de 800 patients ne trouve aucune différence entre les 2 sources de FVIII<sup>186</sup>. L'année suivante, des résultats d'une étude menée sur 574 PUPs conclut à une absence de différence entre rFVIII et pdFVIII et un risque identique en cas de changement de produit<sup>187</sup>. Finalement, l'étude prospective SIPPET (Study on Inhibitors in Plasma-Product Exposed Toddlers) a comparé 251 PUPs répartis aléatoirement et conclut une augmentation du risque d'inhibiteurs d'1,8 fois avec le rFVIII<sup>188</sup>. Si cette étude ne mettra probablement pas fin au débat, on peut penser que les modifications post-transcriptionnelles des rFVIII produits dans différents types cellulaires puissent différer des celles du pdFVIII et jouer sur l'immunogénicité du FVIII thérapeutique. De plus, les autres protéines présentes dans les préparations de pdFVIII, notamment le vWF, pourraient également jouer un rôle protecteur en réduisant l'endocytose du FVIII et donc en diminuant le risque de réponse immunitaire.



**Figure 10. Facteurs de risques liés à l'apparition d'inhibiteurs.** Effet protecteur (« risque diminué », bleu) ou prédisposant (« risque augmenté », rouge) des différents facteurs de risque intrinsèques au patient (partie haute) ou indépendants du patient (partie basse). D'après Coppola, Haemophilia, 2010.

En conclusion, il est très difficile d'identifier un ou plusieurs risque(s) qui pourrai(en)t favoriser l'apparition d'inhibiteurs. L'apparition de cette réponse immunitaire semble être la conséquence de complexes interactions entre ces facteurs de risque avec comme conclusion qu'il y a trois types de patients : (1) ceux chez qui les inhibiteurs ne se développeront jamais ; (2) ceux chez qui cela dépendra du traitement ; (3) ceux chez qui les inhibiteurs se développeront systématiquement<sup>187</sup>. Pour ne pas rester face à ce constat peu prédictif, les membres de l'étude CANAL (Concerted Action on Neutralizing Antibodies in patients with severe haemophilia A) ont mis en place un score pour évaluer les risques d'apparition des inhibiteurs et ainsi tenter d'individualiser la prise en charge des PUPs<sup>189</sup>. Ce score fondé sur un modèle de régression multivariée, prend en compte les 3 facteurs de risques les plus décrits dans cette cohorte, à savoir l'historique familial, la

mutation de *F8* et la dose de FVIII à la première injection. Il associe respectivement 2, 2 et 3 points à chacun des facteurs, lorsqu'il est présent ou à fort risque. Chaque patient obtient ainsi un score sur 7 auquel est associée une probabilité de développement d'inhibiteurs. A partir de ce score, le patient est classé comme ayant un « risque important » (>50%), « intermédiaire » (> 25%) ou un « faible risque ».

Score	Probabilité d'inhibiteurs	Antécédents familiaux	Type de mutation de <i>F8</i>	Intensité du traitement
0	0,09	Non	Faible risque	Faible
2	0,22	Non	Fort risque	Faible
3	0,36	Non	Faible risque	Fort
4	0,47	Oui	Fort risque	Faible
5	0,63	Non	Fort risque	Fort
7	0,84	Oui	Fort risque	Fort

**Figure 11. Score clinique CANAL (Concerted Action on Neutralizing Antibodies in patients with severe haemophilia A).** Probabilité de développer des inhibiteurs en fonction des antécédents familiaux, du type de mutation de *F8* et de l'intensité du traitement. Ce score, fondé sur 3 critères reconnus pour influencer l'apparition d'inhibiteurs, vise à permettre une individualisation de la prise en charge en fonction du score. D'après Ter Avest, J. *Thromb. Haemost.*, 2008.

Ce score a été ensuite confronté à une cohorte et a donné des résultats très probants. Par ailleurs, ce score présente l'avantage de pouvoir être utilisé en clinique même si l'un des critères n'est pas connu. De plus, il est voué à évoluer au fur et à mesure de la validation de nouveaux facteurs de risque.

#### 4. Réponse immunitaire

Du point de vue immunologique, qu'il soit endogène ou thérapeutique, le FVIII ne devrait théoriquement pas induire une réponse du système immunitaire. En effet, dans le premier cas, le FVIII est une protéine synthétisée par l'hôte, il participe à la sélection thymique et à l'élimination des lymphocytes auto-réactifs (cf. paragraphe sur les LT). Dans le second cas, l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique est relativement surprenante car le FVIII est injecté par voie intraveineuse (décrite comme peu immunogène)<sup>190</sup>, à faible dose et sans adjuvant. Malgré tout, le FVIII est reconnu par le système immunitaire dans trois situations :

La première d'entre elle est physiologique. En effet, des anticorps anti-FVIII naturels ont été détectés dès 1992 chez 17% de donneurs sains<sup>191</sup>. Ces immunoglobulines (Ig) de classe G (IgG) sont le reflet d'une reconnaissance du FVIII endogène par le système immunitaire. En effet, ces donneurs ont des niveaux normaux de FVIII, mais également des anticorps qui inhibent l'activité pro-coagulante du FVIII. De plus, les titres inhibiteurs déterminés pour chacun des patients ne corrèlent pas avec la quantité d'IgG anti-FVIII déterminée par ELISA. Cela laisse donc supposer que les anticorps anti-FVIII comprennent à la fois des anticorps neutralisants, mais également des anticorps qui se fixent au FVIII, sans pour autant inhiber son activité<sup>192</sup>. Une étude plus récente a confirmé que 19% des individus sains produisent des IgG anti-FVIII et que chez les patients avec inhibiteurs, les Ig qui sont inhibitrices sont des IgG4<sup>193</sup>. Ainsi, le FVIII n'est-il pas invisible pour le système immunitaire des individus sains ; il est toléré. Cette tolérance à une molécule du Soi repose sur un fragile équilibre entre reconnaissance par le système immunitaire et régulation de cette reconnaissance. Un mécanisme de régulation proposé est l'existence d'anticorps anti-idiotypiques. En effet, il a été montré que des IgG des donneurs sains pouvaient éviter la liaison d'anticorps neutralisants au FVIII, suggérant ainsi l'existence d'anticorps anti-idiotypiques du FVIII chez des individus sains<sup>194</sup>. Ces anticorps sont dirigés contre le site de reconnaissance du FVIII des inhibiteurs. Ils entrent ainsi en compétition avec le FVIII et diminuent la probabilité de fixation des inhibiteurs au FVIII.

Lorsque l'équilibre réponse/régulation se rompt, on tombe alors dans une situation pathologique. C'est ce qui se passe chez 1 personne sur 1 million, chez qui l'apparition spontanée d'auto-anticorps (anticorps dirigés contre le FVIII endogène) déclenche des symptômes hémorragiques. On parle alors d'hémophilie A acquise. L'apparition de ces auto-anticorps est soit idiopathique, soit associée, dans 40 à 50% des cas, à une autre maladie (maladie auto-immune, tumeur, allergie à un traitement). Elle peut également être liée à la période de post-partum<sup>195,196</sup>. L'utilisation de pools thérapeutiques d'IgG de donneurs sains (Immunoglobulines intraveineuses - IgIV) a montré des effets bénéfiques lorsqu'ils ont été utilisés chez ces patients<sup>197</sup>. Un mécanisme proposé était l'effet protecteur des anticorps anti-idiotypiques naturels contenus dans les IgIV<sup>198,199</sup>.

L'autre situation pathologique dans laquelle on déplore l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII est la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique

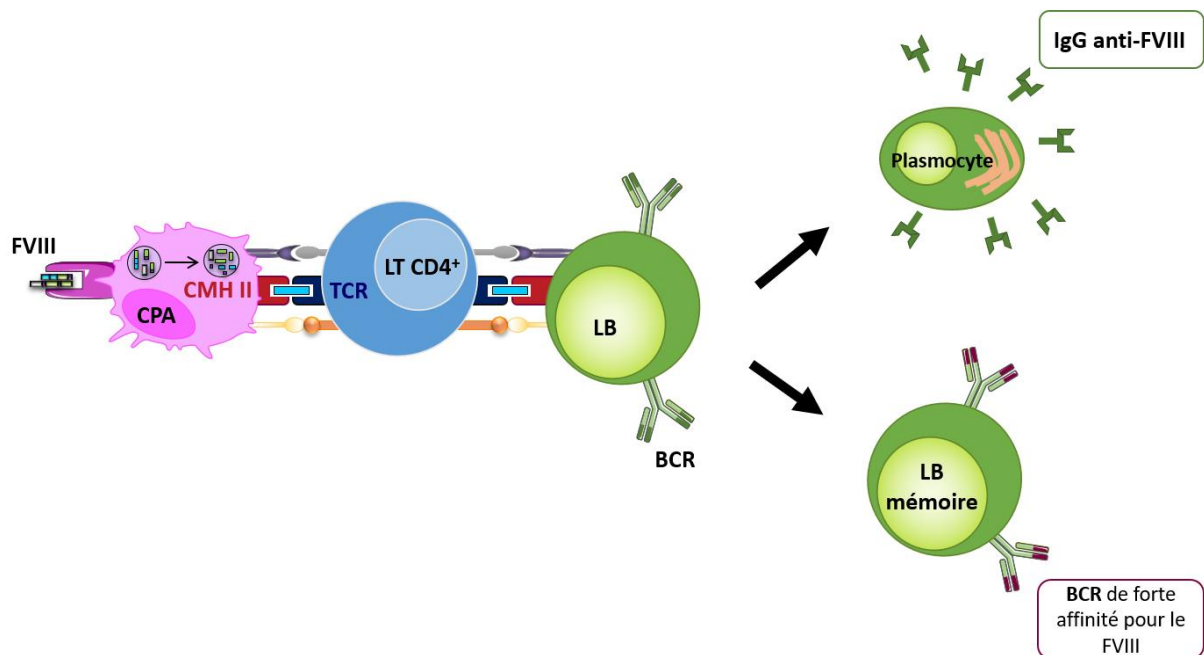
chez les patients atteints d'hémophilie A congénitale. Cette réponse humorale polyclonale se manifeste par le développement d'anticorps anti-FVIII qui apparaissent généralement au cours des premiers jours d'exposition au FVIII<sup>168,200</sup>. De manière générale, les anticorps anti-FVIII appartiennent aux sous-classes 1 et 4 (IgG1 et IgG4)<sup>193,200,201</sup>, même si ces sous-classes ne représentent que 5% des IgG dans un plasma normal<sup>202</sup>. Une partie de ces anticorps neutralise l'activité du FVIII et sont donc dits « neutralisants », mais certains anticorps anti-FVIII ne le sont pas. De plus, nous avons également vu que les anticorps neutralisants étaient majoritairement d'isotype IgG4<sup>193</sup> et il a récemment été démontré chez des patients que les anticorps neutralisants ont une affinité 100 fois plus importante pour le FVIII que les non-inhibiteurs<sup>203</sup>. Plusieurs mécanismes de neutralisation de l'activité pro-coagulante ont été avancés, notamment l'encombrement stérique qui empêche la liaison du FVIII avec ses partenaires de la cascade de la coagulation (FIXa, FX, thrombine, phospholipides, vWF...), l'augmentation de clairance des complexes immuns formés ou l'hydrolyse du FVIII par des anticorps catalytiques<sup>204-208</sup>. Pour ce qui concerne les domaines ciblés par les anticorps inhibiteurs, il a été montré qu'ils reconnaissent principalement le A2 et le C2<sup>209,210</sup>. Cependant, d'autres sites ont été identifiés, sur la chaîne légère du FVIII (interférant avec les sites de fixation à la protéine C activée ou au FIX)<sup>211-213</sup> et sur la chaîne lourde<sup>214</sup>. De plus, la spécificité des épitopes peut évoluer au cours du temps chez un même patient<sup>215</sup>. Pour mesurer cette capacité inhibitrice des anticorps anti-FVIII, une variante de la méthode Bethesda<sup>216</sup> est utilisée. Ce test, appelé « Test Nijmegen » (Nijmegen Assay) permet d'évaluer l'inactivation de l'activité pro-coagulante en fonction de la dilution de plasma. Il est ainsi possible de déterminer la dilution de plasma nécessaire à l'inhibition de 50% de l'activité FVIII d'un donneur sain après 2h d'incubation à 37°C<sup>217</sup>. L'inverse de cette dilution est défini comme le nombre d'unités Bethesda par millilitre de plasma (UB/mL). Les patients sont considérés comme ayant des inhibiteurs lorsque leur titre inhibiteur est supérieur à 0,6 UB/mL. Parmi ces patients, on distingue des patients « faibles répondeurs » (<5 UB/mL) et « forts répondeurs » (>5 UB/mL)<sup>9,218</sup>. La différence entre ces patients est que les premiers gardent un faible titre après plusieurs injections de FVIII, tandis que le titre inhibiteur des forts répondeurs continue d'augmenter au fur et à mesure des injections (réponse anamnétique)<sup>219</sup>. Ainsi, chez les faibles répondeurs il est possible d'utiliser de fortes

doses de FVIII comme traitement, en revanche pour les forts répondeurs, les stratégies sans FVIII doivent être privilégiées.

*Description générale de la réponse anti-FVIII thérapeutique*

La réponse contre le FVIII thérapeutique se déroule comme une réponse immunitaire classique contre un antigène exogène<sup>192</sup>. Lors de la première rencontre entre le système immunitaire et le FVIII se déclenche une réponse dite « primaire ». La première étape de celle-ci est la reconnaissance du FVIII thérapeutique circulant par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Le FVIII est endocyté par ces CPA via la voie endosomale et clivé en peptides de 13 à 18 aa. Ces peptides sont ensuite chargés sur des molécules de CMH II, constituant ainsi un complexe CMH/peptide. Suite à cet apprêtement du FVIII, le complexe est exprimé à la surface des CPA et reconnu par le récepteur des LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques du FVIII, le TCR (T Cell Receptor). La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR permet l'activation du LT. Ce dernier migre dans la rate où il entre en contact avec un lymphocyte B (LB). Ce LB naïf, qui exprime un BCR (B Cell Receptor) spécifique du FVIII, aura préalablement reconnu le FVIII via son BCR et l'aura également apprêté et présenté sur son CMH II. Il interagit ainsi avec le LT activé, permettant l'activation subséquente du LB naïf. Le LB actif prolifère alors et se différencie, soit en LB mémoire, soit en plasmocytes. Ces derniers sont les cellules productrices des anticorps anti-FVIII.

De leur côté, les LB qui vont devenir mémoire expriment un BCR qui subit une maturation d'affinité et une commutation isotypique, ce qui leur permet d'acquérir un BCR de très forte affinité pour l'antigène, en l'occurrence ici, le FVIII. Ce BCR de forte affinité permet, lors d'une seconde rencontre avec le FVIII, le déclenchement d'une réponse beaucoup forte et rapide que la première fois ; la réponse mémoire (ou secondaire). Les anticorps synthétisés ici ont une plus forte affinité pour le FVIII ( $K_d=10^{-11} \text{ M}^{-1}$ )<sup>220</sup> et sont majoritairement des IgG, ce qui fait échos aux observations décrites précédemment. Si le schéma global de la réponse immunitaire est très bien décrit<sup>192,221,222</sup>, certains éléments, notamment dans les étapes précoces de cette réponse, restent jusqu'à aujourd'hui, peu connus.



**Figure 12. Réponse immunitaire anti-FVIII.** La réponse anti-FVIII est une réponse immunitaire classique contre un antigène T-dépendant. Elle débute par l'endocytose du FVIII par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), au sein desquelles le FVIII est apprêté et dont les peptides (rectangle cyan) sont présentés sur le CMH II. Le complexe CMH-peptide est reconnu par le TCR d'un LT CD4<sup>+</sup> naïf qui, suite à l'interaction des molécules de co-stimulation CD40 (violet)-CD40L (gris) et CD80/86 (jaune)-CD28 (orange), s'active. Il migre ensuite dans la rate où il active à son tour un LB naïf ayant un BCR spécifique du FVIII. Le LB s'active via la même synapse immunologique qu'entre la CPA et le LT et se différencie, soit en plasmocyte qui sécrète des inhibiteurs (IgG anti-FVIII), soit en LB mémoire qui, après l'hypermutation somatique et la commutation de classe, exprimera un BCR de forte affinité pour le FVIII. Lors d'une nouvelle exposition au FVIII, ces LB mémoires peuvent jouer le rôle de CPA en reconnaissant le FVIII via leur BCR de forte affinité. Il peut alors le présenter à un LT et se différencier en plasmocyte sécréteur d'anticorps de forte affinité.

### Endocytose et apprêtement du FVIII

La première étape, essentielle au développement d'une réponse immunitaire est la rencontre entre les CPA et l'antigène, suivie par l'internalisation de ce dernier. Dans le cas du FVIII, il a été montré chez la souris que cette rencontre se faisait principalement dans la rate<sup>223</sup>. En effet, en plus de la présence de FVIII et de CPA dans la zone marginale de la rate, la splénectomie de souris déficientes en FVIII cause une réduction drastique de la production d'anticorps anti-FVIII. Malgré tout, lorsque la rate est absente ou non fonctionnelle, une production résiduelle est détectée, suggérant une initiation de la réponse dans d'autres organes lymphoïdes secondaires. De plus, les cellules présentant le FVIII n'ont pas été identifiées.

En effet, concernant les CPA impliquées dans l'endocytose du FVIII thérapeutique, elles n'ont aujourd'hui pas été formellement identifiées. Dans le cadre d'une réponse primaire, il semble que les LB spécifiques du FVIII soient trop peu nombreux pour jouer le rôle de CPA. Ce sont donc d'autres CPA comme les cellules dendritiques (Dendritic cells - DC), dites « CPA professionnelles », ou les macrophages qui sont probablement impliqués. En effet, lorsqu'elles sont immatures, les DC ont la capacité de « scanner » le milieu qui les entoure. Lorsqu'elles captent un antigène, elles deviennent matures, perdent leur capacité d'internalisation et commencent le processus d'apprêtement antigénique. Ainsi a-t-il été montré *in vitro* au laboratoire que les MO-DC endocytent le FVIII et le présentent aux LT CD4<sup>+</sup> humains spécifiques du FVIII<sup>158</sup>. L'endocytose du FVIII par différents modèles de DC a par la suite été confirmée par d'autres équipes<sup>161,224</sup>. Les macrophages quant à eux sont issus de monocytes qui migrent dans un tissu et se différencient en macrophages résidents spécifiques de ce tissu. Ils possèdent une grande capacité de phagocytose qui leur permet de jouer un rôle fondamental, notamment dans l'élimination des débris cellulaires et des pathogènes<sup>225</sup>. Concernant le FVIII, des travaux du laboratoire ont montré que le FVIII s'accumule dans la zone marginale de la rate, au niveau des macrophages métallophiliques<sup>223</sup>. De plus, les macrophages expriment plusieurs récepteurs capables de fixer le FVIII, notamment Siglec 5<sup>226</sup> et LRP-1<sup>227</sup>. Enfin, la déplétion des macrophages et des cellules dendritiques conduit à une diminution significative de la réponse anti-FVIII. Malgré cela, l'importance pour l'induction par les macrophages de la réponse immunitaire anti-FVIII de l'endocytose du FVIII n'a jamais été démontrée *in vivo*. Dans le cas d'une réponse mémoire, les patients ont des LB mémoires exprimant un BCR de forte affinité pour le FVIII. Cette forte affinité peut dès lors permettre aux LB mémoires de reconnaître le FVIII et de jouer le rôle de CPA.

#### *CD206 et récepteurs d'endocytose*

L'endocytose est une étape clé de la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII. Ainsi, elle fait l'objet de nombreuses études afin d'identifier les facteurs qui la contrôlent. Jusqu'à présent, les récepteurs impliqués dans la reconnaissance du FVIII par les CPA n'avaient, eux non plus, jamais été identifiés. Le premier récepteur d'endocytose permettant une activation des LT CD4<sup>+</sup> en réponse au FVIII, identifié est le Macrophage Mannose Receptor (MMR ou CD206)<sup>228</sup>. En effet, il a été montré au laboratoire que



l'inhibition des récepteurs sensibles aux mannoses permet la diminution de 50% de l'endocytose du FVIII par des MO-DC et ne permet plus l'activation de LT CD4<sup>+</sup> <sup>158</sup>. Le CD206 est exprimé notamment par les macrophages, par les DC et certaines cellules de la microvasculature. Son implication dans la clairance de molécules endogènes, dans la présentation antigénique et dans l'activation cellulaire a également été décrite<sup>229</sup>. Malgré tout, l'existence d'une endocytose résiduelle implique l'existence d'autres récepteurs d'endocytose du FVIII. De plus, le rôle du CD206 vis-à-vis du FVIII doit être confirmé, notamment *in vivo*.

Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine C2 (BO2C11) a permis de démontrer l'implication de ce domaine dans l'endocytose du FVIII *in vitro*, mais pas *in vivo*<sup>160,230</sup>. De façon similaire, l'utilisation d'un autre anticorps monoclonal, Km33, dirigé contre le domaine C1 du FVIII inhibe l'endocytose du FVIII par des DC murines et humaines *in vitro*. De plus, la co-injection de Km33 et du FVIII à des souris déficientes en FVIII réduit l'immunogénicité du FVIII<sup>161</sup>. Le domaine auquel se lie Km33 correspond au site de fixation du FVIII au récepteur CD91. Ces récepteurs aux LDL, décrits précédemment car impliqués dans le catabolisme du FVIII, ont donc été étudiés dans le contexte d'endocytose. Mais aucune étude n'a permis de leur attribuer un rôle dans le déclenchement de la réponse immunitaire<sup>231</sup>.

#### *vWF et endocytose*

Si les cellules et le(s) récepteur(s) permettant l'endocytose n'ont pas été clairement identifiés, il a été démontré que le vWF protège le FVIII d'une reconnaissance par les CPA. En effet, il a été montré *in vitro* que le vWF diminue l'endocytose du FVIII par les MO-DC, menant à une diminution de la capacité de ces cellules à activer des LT CD4<sup>+</sup> <sup>158</sup>. *In vivo*, il a été confirmé que la co-administration de FVIII et de vWF permet de réduire les taux d'inhibiteurs synthétisés par des souris hémophiles<sup>232-234</sup>. Ces résultats sont corroborés par une étude très récente, utilisant un FVIII modifié, possédant un nanobody (anticorps simple chaîne) dirigé contre le vWF à la place du domaine B<sup>235</sup>. Ce FVIII possède une affinité pour le vWF 25 fois plus importante qu'un FVIII BDD et permet une présence de FVIII dans le plasma deux fois plus longue. *In vivo*, 5 injections de ce FVIII modifié n'induisent des anticorps anti-FVIII que chez 12,5% des souris, contre 87,5% pour le FVIII BDD. Le fait que, chez la souris, l'augmentation de l'affinité pour le vWF endogène diminue

l'immunogénicité du FVIII thérapeutique, confirme l'importance du rôle protecteur du vWF. De plus, la comparaison *in vivo* entre pdFVIII et rFVIII montre que, si le pdFVIII active plus les CPA que le rFVIII, il diminue en revanche la production d'inhibiteurs<sup>236</sup>. Cependant, si le vWF protège le FVIII d'une reconnaissance par certains récepteurs, il est possible que le vWF soit, lui, reconnu par d'autres récepteurs, déclenchant l'endocytose du complexe vWF/FVIII et une éventuelle présentation de peptides du FVIII. Certains récepteurs lient le FVIII et le vWF, voire même permettant leur dégradation, ont d'ailleurs été identifiés<sup>237,238</sup>. Parmi eux, on trouve CLEC4M, un récepteur de la famille des lectines<sup>239</sup> et Siglec-5<sup>226</sup>. Très récemment, une étude *in vivo* a identifié le récepteur Stabiline-2 comme jouant un rôle dans la clairance et le déclenchement de la réponse immunitaire anti-FVIII<sup>240</sup>. En effet, cette étude démontre *in vitro* et *in vivo* que le FVIII est internalisé, de manière dépendante du vWF, par Stabiline-2. En effet, le FVIII seul n'interagit que faiblement avec Stabiline-2, mais le complexe FVIII/vWF est lui, internalisé. Chez des souris déficientes en Stabiline-2, la demi-vie du vWF est rallongée et la phase lente de clairance du FVIII est prolongée. Concernant l'effet sur la réponse immunitaire, chez ces mêmes souris, les taux d'anticorps anti-FVIII sont significativement diminués et la co-injection de vWF, de FVIII et d'acide hyaluronique (le ligand naturel de Stabiline-2) engendre une compétition pour la fixation à la Stabiline-2 et induit une diminution du taux d'anticorps anti-FVIII.

Famille	Récepteur	Expression	Liaison au FVIII ?	Liaison au vWF ?	Rôle sur le FVIII	Référence
Récepteurs aux LDL (LDLR)	LRP1	Hépatocytes, Cellules de Kupffer, Macrophages, Cellules dendritiques ...	Domaines A2/A3 (FVIII activé par la thrombine) Chaîne légère (inhibée par le vWF)	En présence de forces de cisaillement	Catabolisme	J. Biol. Chem. 274 (1999) 23734–23739
	Autres LDLR	Ubiquitaire (foie)	Oui	?	Catabolisme	Blood 106 (2005) 906–912.
Lectine	Récepteur à l'asialo-glycoprotéine (ASGPR)	Hépatocytes	Glycanes désialylés du domaine B	Glycanes désialylés N-liés	Catabolisme	J. Thromb. Haemost. 3 (2005) 1257–1265.
	Siglec-5	Monocytes, Macrophages, Neutrophiles, LB	Indépendante des acides sialiques	Acide sialique sur les glycanes N-liés	Catabolisme	Haematologica 97 (2012) 1855–1863.
	CD206	Macrophages, Cellules dendritiques	Glycanes mannosylés exposés (inhibée par le vWF)	Non	Endocytose puis présentation aux LT CD4 <sup>+</sup>	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (2007) 8965–8970.
	CLEC4M (L-Sign)	Foie, Cellules endothéliales lymphatiques sinusoidales	Glycanes fortement mannosylés	Glycanes N-liés	Catabolisme	J. Thromb. Haemost. 11 (2013) 98.
Scavenger classe H	Stabilin-2	Cellules endothéliales sinusoidales lymphatiques, du foie et de la rate	Quand complexé au vWF	Oui	Catabolisme et déclenchement de la réponse immunitaire	J Clin Invest. 2018 20.10.1172/JCI96400

**Figure 13. Récepteurs capables de fixer le FVIII et/ou le vWF.** D'après Lai, Cell. Immunol., 2016.

### *FVIII à longue durée de vie et endocytose*

Contrôler la reconnaissance du FVIII par les CPA est un critère essentiel dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. L'immunogénicité des FVIII modifiés doit donc être étudiée. La PEGylation par exemple a été décrite comme permettant de réduire *in vivo* l'immunogénicité d'enzymes<sup>241</sup>. Pour ce qui concerne le FVIII, il a été démontré que sa PEGylation diminue son endocytose *in vitro* et l'activation des LT. Cela se traduit *in vivo* par une incidence plus faible d'inhibiteurs chez la souris<sup>242</sup>, bien que d'autres études contestent cette conclusion<sup>243</sup>.

Pour ce qui concerne les FVIII-Fc, si l'ajout du fragment Fc permet une reconnaissance de la molécule via le FcRn, il permet également une fixation à d'autres récepteurs Fc (FcR), notamment ceux liant les IgG (FcγR). Or, ces récepteurs sont exprimés par les CPA. Il est donc peu probable que le FVIII-Fc soit inerte d'un point de vue immunologique<sup>244</sup>. On peut par exemple imaginer une activation de l'immunité liée à la reconnaissance de complexes immuns, ou alors la diminution de la réponse, notamment via une interaction avec un FcγR inhibiteur (le FcγRIIb)<sup>245</sup>. Des travaux chez la souris montrent effectivement une immunogénicité légèrement réduite du FVIII-Fc lorsqu'il est donné à 50-100 UI/kg, mais augmentée à plus forte doses<sup>246,247</sup>. Chez les patients, une étude a montré une absence

d'inhibiteurs<sup>248,249</sup>. Cependant, cette étude a été menée sur des patients PTPs, qui sont moins à risque de développer des inhibiteurs que les PUPs. De nouvelles études restent donc à mener pour établir l'effet sur l'endocytose de ce FVIII-Fc. Enfin des résultats récents suggèrent que l'utilisation du scFVIII, qui possède une affinité supérieure pour le vWF, diminuerait également l'incidence des inhibiteurs chez l'Homme<sup>101,250</sup>.

### *Présentation aux lymphocytes T*

L'importance des LT auxiliaires (LT CD4<sup>+</sup>) dans la réponse immunitaire anti-FVIII a été indirectement démontrée notamment par la disparition d'inhibiteurs chez des patients infectés par le VIH qui élimine les LT CD4<sup>+</sup><sup>251</sup>. Une fois internalisé par les CPA, le FVIII est maintenu dans les endosomes où il est clivé en peptides. Ces vésicules fusionnent alors avec d'autres vésicules issues du RE contenant le CMH II pour former les « compartiments contenant les CMH II » (MHC Class II-containing Compartment - MIIC). C'est au sein de ce compartiment que s'effectue la dégradation finale du FVIII et qu'une partie des peptides qui en sont issus, sont chargés sur les molécules de CHM II, permettant la formation du complexe CMH/peptide. La vésicule fusionne alors avec la membrane de la CPA permettant, notamment en conditions inflammatoires, l'expression du complexe à leur membrane<sup>252</sup>. L'ensemble de ces mécanismes constitue « l'apprêtement antigénique ». En parallèle de cet apprêtement par les CPA, ces dernières entrent dans la circulation pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et présenter l'antigène aux lymphocytes T auxiliaires (helper – LTh).

Ces LT CD4<sup>+</sup> font partie des 2 à 5% des thymocytes issus d'un processus de sélection drastique. En effet, dans le thymus des thymocytes subissent une série de sélections (positive et négative) qui engendre la survie des cellules dont le TCR peut fixer un CMH du Soi et s'activer lorsqu'un peptide exogène y est fixé. Ainsi, la sélection positive permet l'élimination des thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas de CMH du soi. La sélection négative consiste en la présentation d'antigènes du Soi et identifie ainsi les thymocytes qui réagissent aux complexes CMH/peptide du Soi. Parmi ces thymocytes de forte affinité pour les complexes CMH/peptide du Soi, certains seront purement et simplement éliminés (risque d'auto-immunité), mais une partie deviendra des LT régulateurs naturels (nTreg). Les facteurs permettant l'engagement vers la lignée Treg plutôt que l'élimination

ne sont pas clairement identifiés. Cependant, il est possible que de subtiles différences dans l'affinité pour le Soi, dans leur stade de maturité au moment du signal, ou leur localisation dans une niche du thymus soit impliquées<sup>253-255</sup>. Ces nTregs jouent un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire, notamment en sécrétant des cytokines régulatrices de l'immunité (par exemple l'IL-10 et le TGF $\beta$ ) ou en interagissant avec les CMH des CPA, empêchant ainsi leur activation. Pour ce qui concerne les thymocytes qui reconnaissent faiblement les peptides du Soi, ils sortent de ce processus de sélection, sont donc « restreints à un CMH » et deviennent soit cytotoxiques (Cytotoxic T Lymphocytes – CTL, CD8<sup>+</sup>), soit auxiliaires. Ce sont ces derniers qui établissent une synapse immunologique avec les CPA qui présentent un peptide du FVIII sur leur CMH II. Cette synapse consiste en la mise en place de trois signaux permettant une activation complète du LT naïf. Le premier de ces signaux est la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR. Cette reconnaissance est stabilisée par un corécepteur du TCR, le CD4 qui va reconnaître le CMH de classe II. Le deuxième signal est la surexpression, par les CPA, des molécules de co-stimulation. Ces molécules renforcent la communication entre les CPA et les LT (par exemple, CD80/86 et CD40 exprimés par les CPA lient le CD28 et CD40L sur les LT, respectivement). Ces molécules de co-stimulation sont absolument essentielles au développement de la réponse immunitaire anti-FVIII. En effet, chez des souris déficientes pour ces molécules ou chez qui elles sont bloquées, on ne constate aucune apparition d'anticorps anti-FVIII<sup>256,257</sup>. Enfin, la production de cytokines pro-inflammatoires par les CPA est le dernier signal permettant l'activation complète du LT naïf en LT CD4<sup>+</sup> effecteur (Teff). Cette activation est immédiatement suivie de leur prolifération et de leur polarisation en sous-populations de Teff. Ainsi, l'effet des LT est-il étudié à travers leur prolifération et à leur polarisation en réponse à un antigène.

Pour ce qui est de la prolifération des LT en réponse au FVIII, elle a été observée comme étant corrélée avec les titres inhibiteurs<sup>258</sup>. En effet, les cellules circulantes déplétées en LB issues de patients à fort titre inhibiteur sont plus sensibles au FVIII que celles de patients à faible titre ou d'individus sains. Il est ainsi à noter que les individus sains ont des LT spécifiques du FVIII. Grâce à une stratégie de stimulation *in vitro* de clones issus de PBMC de donneurs sains, ces LT spécifiques du FVIII ont été estimés à environ 1,7 par million de cellules<sup>259</sup>. Une autre étude montre que ces LT CD4<sup>+</sup> d'individus sains prolifèrent, dans une moindre mesure et transitoirement, en réponse au FVIII ou à des

peptides du FVIII<sup>253,260</sup>. Cependant, il semble que les lymphocytes circulants d'individus sains prolifèrent significativement plus en réponse au domaine A3 que ceux des patients hémophiles. D'après les auteurs de cette étude, cela reflète la sensibilisation des lymphocytes à l'ensemble du FVIII, permettant sa tolérance. Comparativement à la présence continue de 0,1 µg/mL de FVIII, les lymphocytes de patients ne sont confrontés qu'à de faibles doses, ne permettant pas l'exposition à l'ensemble des épitopes présents sur le FVIII<sup>213</sup>. La polarisation des LT, bien qu'étant une étape essentielle au développement de la réponse immunitaire anti-FVIII, ne peut néanmoins pas être assimilée à la production systématique d'inhibiteurs.

Pour ce qui concerne la polarisation, elle est guidée par les cytokines polarisantes constituant le 3<sup>e</sup> signal d'activation du LT. Elles vont notamment permettre la prolifération et la polarisation du LTh en sous-population Th1, Th2, Th17, T régulateurs induits (iTreg) ou Th folliculaires (Tfh). Ces sous-populations cellulaires sont phénotypiquement et fonctionnellement distinctes et influent sur l'orientation de la réponse immunitaire en aval<sup>261</sup>. Chez les patients avec inhibiteurs, les sous-populations Th1 et Th2 sont les plus retrouvées, suivies des Th17<sup>262</sup>. Dans un contexte général, la polarisation Th1 engendre la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) ou l'IL-2. Ce cocktail cytokinique favorise l'activation des CPA et favorise plutôt l'immunité cellulaire (les CTL, NK...), tandis que les cellules Th2 ont globalement tendance à favoriser l'immunité humorale (sécrétion d'anticorps par les plasmocytes). Cependant, il est inexact de voir ces réponses comme antinomiques. Bien qu'une régulation croisée ait été décrite (les cellules Th1 régulent les réponses Th2 et inversement), un type de réponse n'est jamais exclusif par rapport à l'autre. Ainsi, les cellules Th1, via la production d'IL-2 promeuvent également la régulation immunitaire via le développement d'iTreg<sup>263</sup>.

Dans le cadre de la réponse anti-FVIII, la polarisation Th2 semble être associée chez le patient, à des titres inhibiteurs plus forts, tandis que la polarisation Th1 est corrélée avec de plus faibles taux d'inhibiteurs<sup>264</sup>. Des travaux *in vitro* ont complété ces observations en analysant la polarisation de cellules CD4<sup>+</sup> naïves lors de cultures de cellule du sang périphériques (PBMC) de patients sans inhibiteurs, avec inhibiteurs ou de donneurs sains en présence de FVIII<sup>265</sup>. Les LT CD4<sup>+</sup> de patients sans inhibiteurs se polarisaient en Th1 et Tregs, mais pas en Th2. En revanche, celles de patients avec inhibiteurs se polarisent

en Th1 et Th2, mais pas en Tregs. Dans cette même étude, les PBMCs de certains donneurs sains prolifèrent en réponse au FVIII et se polarisent en Th1 uniquement. En revanche, pour les donneurs sains dont les LT ne prolifèrent pas en présence de FVIII, la polarisation s'oriente vers des Tregs. Ainsi, les cellules Th1 joueraient un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII puisque dès que les LT prolifèrent en présence de FVIII, ils s'orientent vers ce profil. Les Th2 induiraient la production d'inhibiteurs, puisque retrouvés uniquement lorsque les LT sont issus de patients avec inhibiteurs. De plus, dans le cas où la réponse se met en place, l'apparition d'inhibiteurs est liée à l'absence de LT régulateurs ou alors à leur mauvaise capacité à réguler<sup>266</sup>.

Ainsi, la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII et la sécrétion d'anticorps par les LB sont la résultante d'un ensemble de mécanismes complexes qui passent notamment par les LT et leurs sous-populations.

### Rôle des lymphocytes B

Les LB se développent dans la moelle osseuse et se caractérisent principalement par l'anticorps membranaire qu'ils expriment. Le processus de maturation vise à permettre aux LB de subir tous les réarrangements géniques nécessaires à l'expression, une fois matures, d'un BCR fonctionnel et spécifique d'un antigène. Ainsi, au cours de leur séjour dans la moelle osseuse, les nombreux stades de maturation des LB (progéniteur, pro-, pré-pro, pré-B) vont subir de multiples réarrangements des gènes codant leur BCR. Un processus itératif permet l'expression de la chaîne lourde de ce dernier, puis d'y associer une chaîne légère. Cela aboutit, au stade B immature, à l'expression d'une IgM membranaire, première forme fonctionnelle du BCR. De plus, chaque allèle de chaîne lourde et légère réarrangé empêche une recombinaison ultérieure. Ce phénomène d'exclusion allélique permet qu'une même cellule B n'exprime à terme, qu'un seul BCR. Puis, sur le même principe que pour les LT, la capacité des BCR à se lier au Soi est évaluée. Cependant, la sélection est moins drastique que dans le cas des LT puisque les LB autoréactifs ne peuvent pas être stimulés sans qu'il n'y ait un LT autoréactif spécifique du même antigène. Malgré tout, les LB dont le BCR reconnaît un antigène du Soi sont éliminés par apoptose ou entrent en anergie (incapable de répondre à un stimulus). Les autres LB immatures, non ou faiblement autoréactifs, sont prêts à migrer vers la rate et les ganglions

lymphatiques en passant par des stades dits « transitionnels » (LB T1 puis T2) pour devenir totalement matures. Au cours de cette migration, des IgD membranaires avec la même spécificité et affinité pour l'antigène que l'IgM sont exprimées. Ainsi, le LB mature exprime des IgM et des IgD membranaires et possède la capacité à circuler dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Si un LB mature naïf n'y rencontre pas son antigène, il mourra par apoptose au bout de quelques mois. En revanche, s'il rencontre son antigène, il le lie via son BCR, l'internalise et en présente des peptides sur son CMH II, tout comme une CPA. Un LT précédemment activé par le même antigène reconnaît le complexe CMH/peptide et active à son tour le LB grâce aux trois signaux précédemment décrits.

Les LB activés retournent alors dans la rate ou les ganglions lymphatiques et certains vont s'y différencier en plasmocytes. On distingue alors soit des plasmocytes qui retournent dans la moelle osseuse pour y nicher et se différencier en plasmocytes à longue durée de vie, soit des plasmocytes à courte durée de vie. Ces derniers forment des foyers primaires, permettant la production de grandes quantités d'IgM de faible affinité lors de la phase précoce de la réponse immunitaire<sup>267</sup>. Une autre partie des cellules stimulées migre vers les follicules des organes lymphoïdes secondaires pour y former un centre germinatif (CG)<sup>268</sup>. Dans ces CG, l'expression de l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) et la présence de Tfh permettent le déclenchement d'un processus d'hypermutation somatique permettant l'augmentation de l'affinité des BCR spécifiques pour l'antigène. D'autre part, AID déclenche également une commutation isotypique, qui change l'isotype des anticorps produits, notamment en IgG. Les LB des CG qui ont subi ces deux événements produisent donc des anticorps de forte affinité pour l'antigène, d'une autre classe qu'IgM<sup>269</sup>. Ces LB sont alors dits « mémoires » puisqu'ils constituent un réservoir de cellules persistant tout au long de la vie, prêtes à réagir contre l'antigène. L'existence de ces LB mémoires permet, dans le cas d'une nouvelle rencontre avec l'antigène, de déclencher une réponse secondaire plus rapide et plus forte que la réponse primaire. En effet, grâce à leur BCR de forte affinité, les LB mémoires peuvent se différencier en plasmocytes en réponse à des concentrations d'antigènes beaucoup plus faibles. De plus, ces plasmocytes sécrètent directement des IgG de forte affinité contre l'antigène.



Dans le cadre de la réponse anti-FVIII, une étude récente a comparé la différenciation des plasmocytes et des LB mémoires circulants de patients avec ou sans inhibiteurs, après stimulation par du FVIII. Il a été trouvé dans tous les groupes des plasmocytes sécrétant des IgM anti-FVIII. Concernant les LB mémoires circulants spécifiques du FVIII, ils ont été estimés chez les patients avec inhibiteurs, entre <0,01 et 0,4% des cellules produisant des IgG<sup>222</sup>. Par ailleurs, ils produisent des IgG anti-FVIII chez les patients avec inhibiteurs, mais pas chez les patients sans inhibiteur<sup>270</sup>. Mis en parallèle avec ce que nous avons vu précédemment, à savoir que les patients sans inhibiteur sécrètent des anticorps de faible affinité pour le FVIII, ces résultats semblent traduire une réponse primaire, sans hypermutation somatique ni commutation isotypique. Ainsi les patients sans inhibiteur sécrètent des IgM et IgG anti-FVIII de faible ou moyenne affinité pour le FVIII<sup>193,203</sup>. En revanche, les inhibiteurs sont majoritairement des IgG4, avec une affinité pour le FVIII 100 fois plus importante que les anticorps non-inhibiteurs<sup>203</sup>, ce qui laisse penser qu'il y a eu une communication entre LT et LB spécifiques du FVIII à la suite de laquelle il y a eu formation de CG et différenciation des LB en plasmocytes à courte et longue durée de vie, ainsi qu'en LB mémoires<sup>271</sup>. Ces LB mémoires seraient alors essentiels au maintien de la réponse humorale anti-FVIII à long terme et au caractère anamnestique de la réponse chez les patients avec de forts titres inhibiteurs<sup>219,272</sup>. Cela a été confirmé chez la souris, où des plasmocytes ont été détectés dans la rate après 2 injections de FVIII, corrélant avec l'apparition d'inhibiteurs dans le plasma. Après la 4<sup>e</sup> et dernière injection de FVIII, leur nombre a diminué, tandis que des plasmocytes ont été détectés dans la moelle osseuse après la 3<sup>e</sup> injection de FVIII et étaient toujours présents plus de 5 mois après la dernière injection<sup>273</sup>.

Pour conclure, comme le montre l'analyse de la littérature et notamment la présence de LT spécifiques du FVIII chez des individus sains et la production d'anticorps anti-FVIII chez environ 20% d'entre eux, l'apparition de la réponse immunitaire inhibitrice anti-FVIII semble plutôt correspondre à l'arrêt du contrôle de celle-ci<sup>274</sup>.

**La seconde partie de cette thèse étudie la possibilité de prévenir et/ou de bloquer la réponse immunitaire anti-FVIII en empêchant l'activation des LB spécifiques du FVIII. Pour ce projet, l'activation des LB est inhibée par blocage de la voie de signalisation du BCR, via un inhibiteur de la Bruton's Tyrosine Kinase (Btk).**

## IV. Stratégies d'induction de tolérance au FVIII

### 1. Induction de tolérance immunitaire (ITI)

#### *Description des protocoles d'ITI*

L'apparition des inhibiteurs constitue une impasse thérapeutique et, à l'heure actuelle, une seule stratégie existe permettant de les faire disparaître. Cette stratégie est « l'induction de tolérance immunitaire » (ITI) et consiste en l'administration répétée de FVIII sur de longues périodes (jusqu'à plusieurs années). Elle rassemble en réalité plusieurs protocoles différents. Le premier à avoir été décrit est le protocole « de Bonn », appelé ainsi car expérimenté pour la première fois en Allemagne par le Pr Brackmann<sup>275,276</sup>. Il consiste en l'injection de fortes doses de FVIII (100 UI/kg) toutes les 12 heures, avec 50 UI/kg d'aPCC en complément. Ce régime est maintenu jusqu'à ce que les titres inhibiteurs aient assez chuté, que l'aPCC puisse être arrêté et compensé par une augmentation de FVIII à 150 UI/kg. Un autre protocole a également été développé qui utilise de faibles doses de FVIII et qui consiste en l'injection de 25 à 50 UI/kg trois fois par semaine<sup>277</sup>. Ce protocole, dit de « Van Creveld », s'il permet une économie financière, requiert cependant un temps de traitement encore plus long. De manière globale, ces stratégies sont un succès chez 65 à 70% des patients<sup>67</sup>. La réussite de l'ITI est évaluée par la disparition des inhibiteurs (<0.6 UB/mL), couplée à la ré-augmentation de l'activité FVIII (>66% de l'activité normale) et de sa demi-vie (> 6h)<sup>278,279</sup>.

Afin d'être capable d'estimer en amont les chances de réussite de l'ITI, de nombreux facteurs prédictifs ont été étudiés, notamment à travers des études rétrospectives de cohortes. C'est ainsi que le pic historique du titre d'inhibiteurs atteint, le titre d'inhibiteurs du patient au début de l'ITI et l'intensité du pic d'inhibiteurs suite au début de l'ITI ont été identifiés<sup>280</sup>. En effet, dans les deux premières semaines d'ITI, un pic d'inhibiteurs est observé et disparaît jusqu'à éradication éventuelle des inhibiteurs. Un pic historique maximal inférieur à 200 UB/mL, un titre d'inhibiteurs au début de l'ITI inférieur à 10 UB/mL et un pic en début d'ITI inférieur à 200 UB/mL ont ainsi été associés à un meilleur pronostic de réussite de l'ITI<sup>281,282</sup>. C'est pour diminuer ce pic initial qu'un autre protocole d'ITI a été développé, qui associe à l'administration de FVIII la prise d'immunosuppresseurs (cyclophosphamide), de fortes doses d'IgIV et/ou

d'immunoabsorption extracorporelle préalable selon le titre d'inhibiteurs du patient (protocole de Malmö)<sup>283</sup>. En revanche, d'autres facteurs ont été proposés mais n'ont, jusqu'à présent, pas été validés de manière certaine. On retrouve ici le débat évoqué précédemment sur le type de préparation de FVIII utilisé (pdFVIII ou rFVIII), la dose utilisée, la discontinuité de l'ITI, la durée entre le diagnostic des inhibiteurs et le début de l'ITI (démarrer dès le diagnostic ou attendre que le taux d'inhibiteurs descende sous les 10 UB/mL) ou encore le protocole d'ITI<sup>284-287</sup>. Il faut noter que pour les patients chez qui l'ITI est un succès, la probabilité de réapparition d'inhibiteurs est de 13% à 1 an et de 33% à 5 ans. Presque un patient sur trois rendu tolérant au FVIII (30%) voit ainsi son titre d'inhibiteurs remonter une fois ; et un sur cinq, plus d'une fois<sup>288</sup>.

Pour les patients chez qui les inhibiteurs subsistent après l'ITI, d'autres stratégies sont alors mises en place. Le passage à un pdFVIII (contenant du vWF) ou l'ajout d'immunosuppresseurs peuvent être envisagés s'ils n'ont pas déjà été utilisés. Autrement, les patients sont traités avec du Rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, un marqueur de différenciation des lymphocytes B<sup>289,290</sup>. La liaison du Rituximab peut engendrer la destruction rapide du LB par le système du complément (complement-dependent cytotoxicity – CDC), la stimulation de l'apoptose ou la lyse du LB par une cellule immunitaire (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – ADCC). La disparition d'auto-anticorps à la suite de l'utilisation de Rituximab a déjà été démontrée dans plusieurs maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde<sup>291</sup>. L'utilisation de cette stratégie s'est avérée efficace dans environ 50% des patients résistants à l'ITI dans une cohorte britannique<sup>292</sup>.

### Mécanismes d'induction de tolérance

Les mécanismes précis qui permettent l'induction de tolérance par ces injections répétées de FVIII sont aujourd'hui toujours méconnus. De manière globale, il semble que la présence continue de FVIII dans un contexte non-inflammatoire permette l'établissement d'une tolérance au FVIII et la disparition des inhibiteurs<sup>293,294</sup>. De plus, cette présence continue semble épuiser les LT CD4<sup>+</sup>, pour lesquels le cycle cellulaire s'interrompt et qui perdent leur capacité de prolifération et de production de cytokines<sup>295,296</sup>. Or, une étude *in vitro* a démontré que ni le FVIII, ni le vWF ne portent de signaux de danger

intrinsèques<sup>163</sup>. Cela appuie l'hypothèse évoquée au paragraphe « Intensité du traitement » selon laquelle l'inflammation subséquente aux saignements pourrait être la source de ces médiateurs de danger.

Comme nous l'avons vu, une fois la réponse immunitaire anti-FVIII mise en place, les patients avec inhibiteurs possèdent d'une part des LT spécifiques du FVIII, des LB mémoire et des plasmocytes à longue durée de vie dans leur moelle osseuse. Sachant que les plasmocytes arrêtent d'exprimer des récepteurs spécifiques de l'antigène pendant leur différenciation<sup>297</sup>, il est peu probable qu'ils soient éradiqués pendant l'ITI. En revanche, il est possible que les LT ou les LB mémoire soient eux inhibés ou éliminés par cette stratégie. Ce qui correspond aux observations chez les patients où les LB mémoire spécifiques du FVIII ne sont plus détectées lorsque l'ITI fonctionne<sup>298</sup>.

Une étude d'Hausl et al. en 2005 a montré chez la souris que la stimulation et la différenciation des B mémoire est dépendante des doses de FVIII utilisées<sup>299</sup>. Des LB mémoire (des splénocytes déplétés en plasmocytes) de souris hémophiles immunisées contre le FVIII peuvent être restimulés entre 100 pg/mL et 1 µg/mL de FVIII, mais pas au-delà de cet intervalle. Ainsi, les concentrations physiologiques de FVIII ont tendance à promouvoir la génération de LB mémoire. En revanche, au-dessus de ce seuil, l'exposition au FVIII semble causer une inhibition irréversible des LB mémoire, indépendante des LT, via l'activation de caspases, molécules impliquées dans l'apoptose. Ces travaux confirment une observation selon laquelle le succès de l'ITI ne serait pas dépendant de la délétion des LT spécifiques du FVIII<sup>300</sup>.

Par ailleurs, il a été montré que l'induction de tolérance via l'ITI est corrélée avec la génération d'anticorps anti-idiotypiques<sup>301,302</sup>. Ceux-ci empêchent les inhibiteurs de reconnaître le FVIII et semblent également inhiber les LB spécifiques du FVIII en liant le BCR des LB spécifiques du FVIII<sup>303</sup>. L'ensemble de ces phénomènes pourrait donc expliquer l'induction de tolérance au FVIII par les protocoles d'ITI.

Par ailleurs, d'autres mécanismes supposés dans l'ITI sont à l'étude. Deux études *in vivo* ont montré que l'exposition chronique à de faibles doses d'antigène (autre que le FVIII) permet la génération *de novo* de Tregs, notamment à partir de LT matures, permettant l'établissement d'une tolérance à cet antigène<sup>304,305</sup>. Dès lors, l'implication des Tregs a été étudiée.

De manière générale, les LT régulateurs sont, comme leur nom l'indique, les principales cellules permettant la régulation de la réponse immunitaire par l'inhibition des LT effecteurs (qui correspondent à tous les LTh sauf les Tregs). Comme nous l'avons vu (paragraphe « présentation aux lymphocytes T »), il existe des Tregs naturels, issus de la sélection thymique, ainsi que des Tregs induits qui sont une sous-population de LTh. Si l'ensemble de ces Tregs est caractérisé par l'expression de CD25 et FoxP3, la contribution de chacune de ces sous-populations à la régulation de la réponse immunitaire n'est pas clairement établie<sup>306</sup>. En revanche, il a été décrit que ces Tregs jouent un rôle central dans le maintien de la tolérance au Soi, permettant notamment la prévention de l'auto-immunité, l'induction de la tolérance maternelle au fœtus et la tolérance orale (tolérance contre les antigènes alimentaires). Ils ont également été montrés comme protecteurs contre les allergies et les pathogènes. Tout comme les LT, ils possèdent un TCR et leur activation est antigène-spécifique. En revanche, un débat existe quant à savoir s'ils peuvent inhiber les LT avec une autre spécificité antigénique que la leur, ou pas<sup>307</sup>. De même, les mécanismes par lesquels ils exercent leur fonction suppressive restent à préciser. Ils semblent néanmoins pouvoir agir de trois façons différentes. La première est le contact direct avec la cellule cible. En effet, des expériences *in vivo* ont montré que l'expression de CTLA-4, qui se lie aux molécules de co-stimulation des CPA (signal 2), empêche ainsi l'activation du LT<sup>308</sup>. Le second moyen par lequel ils inhibent les Teff est la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF $\beta$ , comme démontré chez la souris<sup>309,310</sup>. Enfin, il semble que les Treg puissent également entrer en compétition avec les Teff pour capter les cytokines activatrices. Les Teff alors privés de ces cytokines meurent par apoptose, comme montré *in vivo*<sup>311</sup>. De plus, il est probable que ces mécanismes soient redondants et que certains s'activent ou s'arrêtent selon le contexte<sup>312</sup>.

Quant à leur possible rôle dans l'ITI, une étude *in vivo* chez la souris a montré que des Treg pourraient être impliqués, sans pour autant élucider par quels mécanismes<sup>313</sup>. Au cours de cette étude, des souris ont été rendues tolérantes au FVIII par transfection durant la période néonatale, puis confrontée à 4 injections de FVIII. Les auteurs ont ainsi détecté la génération de Tregs, ainsi que la production d'IL-10. La régulation des Teff par les Treg engendrerait l'arrêt de la différenciation de nouvelles cellules B mémoires en plasmocytes. Dans ce contexte, les plasmocytes à longue durée de vie générés lors des

premières injections de FVIII durant l'ITI seraient éliminés sans qu'ils puissent être réapprovisionnés par de nouveaux plasmocytes<sup>298</sup>. Cependant, cela n'explique pas pourquoi la tolérance se met en place alors que les LB mémoires ont la capacité de reconnaître directement le FVIII, à se comporter en CPA et à se différencier en plasmocytes.

## 2. Nouvelles stratégies d'induction de tolérance

Etant donné la longueur, le coût et les relativement faibles taux de réussite de l'ITI, de nouvelles stratégies visant à induire la tolérance au FVIII sont développées. En effet, si l'utilisation concomitante d'immunosuppresseurs permet une amélioration du taux de réussite, l'immunosuppression n'est en rien spécifique du FVIII et peut avoir d'autres conséquences pour le patient. C'est pourquoi les LT et les LB spécifiques du FVIII sont les cibles principales de ces nouvelles stratégies.

L'inhibition de l'activation des LT est étudiée par plusieurs équipes. Ainsi, le blocage des molécules de co-stimulation des LT (signal 2) a fait l'objet de nombreuses études. En effet, il a été montré que des souris hémophiles invalidées pour une molécule de co-stimulation (B7.2 ou CD86) ne développent pas d'inhibiteurs. Par ailleurs, la même équipe a démontré que l'injection de CTLA-4 couplé à un fragment d'IgG1 (CTLA-4-Ig) permet le blocage de l'activation T via l'inhibition de cette même liaison entre B7.2 et CD28, son récepteur. Les souris qui reçoivent du CTLA-4-Ig la veille et le lendemain de la première injection de FVIII ne produisent ainsi pas d'inhibiteurs pendant les 4 semaines après l'injection, malgré trois autres injections de FVIII<sup>256</sup>. De même, l'utilisation d'un anticorps empêchant la liaison entre le CD40 (exprimé par les CPA) à son ligand (CD40L exprimé par les LT), permet chez la souris de prévenir la réponse humorale anti-FVIII. Si l'administration de l'anticorps la veille de l'injection de FVIII permet d'éviter le développement d'une réponse, l'induction d'une tolérance à long terme n'est pas systématique<sup>257,314</sup>. Une autre stratégie ciblant la synapse entre la CPA et le LT est l'utilisation de fragment f(ab)<sub>2</sub> d'un anticorps anti-CD3. Le CD3 étant un corécepteur du TCR, l'utilisation de ce fragment modifie le complexe CD3/TCR, ce qui modifie le signal qu'il transmet. Cela conduit à l'anergie, voire l'apoptose du LT, ou à sa différenciation en Treg. *In vivo*, cette stratégie permet ainsi la génération de Tregs spécifiques du FVIII, permettant une diminution du

nombre de T<sub>eff</sub> et une tolérance au FVIII, au moins à court terme<sup>294</sup>. La modification du ratio Treg/T<sub>eff</sub> au profit des Tregs a également été obtenue par la co-injection, avec du FVIII, de rapamycine qui est un inhibiteur de la voie de l'IL-2<sup>315</sup>. L'IL-2, en tant que cytokine agissant sur les LT, est en effet une cible de choix pour ces nouvelles thérapies. L'injection d'un complexe IL-2/anti-IL-2 a ainsi permis la génération de Tregs, confirmant des résultats antérieurs dans des mélanomes, carcinomes et maladies auto-immunes<sup>316</sup>. Cette génération de Tregs inhibe la production d'inhibiteurs et permet la tolérance au FVIII<sup>317</sup>. Malgré tout, ces techniques sont spécifiques des LT activés par un antigène, quel que soit cet antigène. Pour pallier à cette absence de spécificité au FVIII, le génie génétique a été utilisé afin de faire exprimer par des Tregs de donneurs sains un TCR spécifique du FVIII. La génération de Tregs spécifiques du FVIII a permis, *in vitro* une suppression des T<sub>eff</sub>, ainsi que la suppression de la différenciation des LB mémoires en plasmocytes<sup>318</sup>. Une autre stratégie consiste à identifier les épitopes présents sur le FVIII dans le but de les modifier et d'éviter la présentation de peptides du FVIII<sup>319</sup>. Pour cela, l'utilisation de tétramères (molécules recombinantes mimant le CMH) ou l'utilisation de souris exprimant un CMH humain sont les outils les plus couramment utilisés<sup>320</sup>.

**La troisième et dernière partie de cette thèse vise à caractériser une nouvelle lignée murine hémophile et exprimant un CMH II humain, le HLA-DRB1\*01:01. L'objectif de ce projet est de caractériser les souris naïves, ainsi que la réponse immunitaire anti-FVIII qu'elles développent après immunisation.**

Concernant les LB, des travaux du laboratoire ont évalué la possibilité d'inhiber les plasmocytes via un inhibiteur du protéasome, le bortézomib<sup>321</sup>. Malgré une diminution du nombre de plasmocytes, les titres inhibiteurs n'ont pas diminué, laissant suggérer que les plasmocytes spécifiques du FVIII n'ont pas été atteints par cette stratégie. Une autre approche consiste à faire exprimer par des LB activés (blastés) les domaines immunodominants du FVIII (A2 et C2) couplés à la chaîne lourde d'une IgG<sup>322</sup>. En effet, cette partie des IgG contient des « régitoques T » (ou Tregitoques), des épitopes qui semblent recruter des Tregs<sup>323</sup>. Cette stratégie, déjà démontrée dans le cas de lipopolysaccharides (LPS), permet l'induction de tolérance vis-à-vis de l'antigène<sup>324</sup>. Plus récemment, les fragments A2-Fc et C2-Fc ont également été utilisés au laboratoire pour induire une

tolérance materno-fœtale<sup>325</sup>. Lors de ce travail, ces antigènes injectés à des souris gestantes étaient transférés au fœtus via la liaison au FcRn, exprimé par le syncytiotrophoblaste. La présence de ces domaines du FVIII lors du développement du système immunitaire permet le développement de Tregs, à la fois centraux et périphériques, induisant une tolérance au FVIII.

Enfin, l'utilisation de la thérapie génique a permis de développer une stratégie consistant en l'injection à des souris hémophiles de mégacaryocytes exprimant du FVIII<sup>326,327</sup>. Ces précurseurs donnent des plaquettes, qui synthétisent également le vWF et contiennent ainsi des complexes intracellulaires FVIII/vWF, maintenus dans des granules et augmentant significativement la demi-vie du FVIII<sup>328</sup>. *In vivo*, cette reconstitution de la moelle osseuse par des mégacaryocytes permet de diminuer la probabilité d'inhibition par les IgG anti-FVIII puisque les plaquettes activées au site du saignement relarguent le FVIII proche du lieu où il agit. Cela diminue ainsi son temps de présence dans la circulation et diminue la probabilité qu'il soit reconnu par les inhibiteurs. De plus, la production de ce FVIII par les plaquettes permet l'induction d'une tolérance qui se traduit par l'absence d'inhibiteurs en réponse au FVIII, 16 semaines après la transplantation des plaquettes, même chez des souris ayant déjà développé des inhibiteurs<sup>329</sup>. Cette tolérance semble médiée par les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques au FVIII<sup>330</sup>.

## V. Objectifs

Les objectifs de ma thèse ont été de proposer et de valider de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients atteints d'hémophilie A, ainsi que de caractériser un nouveau modèle d'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII.

Le premier axe de ma thèse a consisté à évaluer une stratégie alternative à la thérapie de substitution. En effet, le traitement des hémorragies par injection de la protéine FVIII est compliqué par la faible demi-vie de celle-ci, son coût, ainsi que la nécessité d'un traitement à vie. J'ai donc cherché à valider une nouvelle stratégie qui repose sur l'utilisation d'ARNm transcrits *in vitro* (*In vitro* Transcribed – IVT mRNA)<sup>331</sup> codant le FVIII. Cette stratégie repose sur l'hypothèse qu'une unique injection d'ARNm permet une production de FVIII continue, permettant une présence de FVIII dans le plasma beaucoup plus longue que la demi-vie du FVIII. J'ai ainsi cherché à valider la production de FVIII endogène *in vitro*, mais



également *in vivo*, dans un modèle murin d'hémophilie A sévère. J'ai également étudié l'effet de l'injection intraveineuse de ces ARNm sur la correction du phénotype hémorragique.

Le second aspect de ma thèse s'est intéressé à éviter la complication la plus courante chez les patients hémophiles, qu'est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII. J'ai ainsi étudié la possibilité d'éviter le développement de cette réponse immunitaire en inhibant les lymphocytes B spécifiques du FVIII par inhibition de la Bruton's Tyrosine Kinase, un élément essentiel de la voie de signalisation du BCR. La Btk est une cible thérapeutique de choix puisqu'elle intervient notamment dans l'activation, la survie et la prolifération des LB. Elle est ainsi devenue une molécule cible dans le traitement des proliférations lymphoïdes B malignes ou de certaines maladies auto-immunes<sup>332</sup>. J'ai donc évalué le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la Btk dans le cadre d'une réponse primaire et d'une réponse mémoire au FVIII.

Enfin, la dernière partie de ma thèse a consisté en la caractérisation d'un modèle murin d'hémophilie A, humanisé pour le CMH de classe II. Les modèles murins actuels sont de bons substituts pour l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII puisque plus de 70% des souris développent une réponse après plusieurs injections de FVIII thérapeutique. De plus, comme chez les patients, elle est dépendante des LT CD4<sup>+</sup> et se traduit par l'apparition d'IgG anti-FVIII inhibitrices<sup>333</sup>. Cependant, dans ces modèles, le FVIII est pris en charge par des CPA murines qui présentent les peptides sur un CMH murin. Ainsi, l'analyse *in vivo* du répertoire de peptides du FVIII présentés et l'évaluation de FVIII dans lesquels les épitopes T humains ont été modifiés n'est pas possible. Ce sont en effet les peptides de forte affinité pour le CMH murin qui sont présentés. J'ai donc caractérisé un modèle murin développé au laboratoire de souris invalidées pour le gène du FVIII et ceux du CMH I et II murins et transgéniques pour les gènes du CMH I et II humains. J'ai ainsi étudié les animaux naïfs ainsi que la réponse immunitaire anti-FVIII chez des animaux immunisés avec du FVIII thérapeutique.

# RESULTATS

## **I. Correction des saignements par injection d'ARNm codant le FVIII dans un modèle murin d'hémophilie A**

**(Soumis à Blood, réf BLOOD/2018/836072)**

La prévention ou le traitement des saignements chez les patients hémophiles A se fait par injection de FVIII exogène. Ce FVIII est issu soit du plasma de donneurs sains, soit du génie génétique. Qu'il soit purifié à partir de plasma ou recombinant, sa production est compliquée et coûteuse. De plus, la demi-vie du FVIII est courte (environ 12 heures), ce qui oblige à des injections fréquentes et altère considérablement la qualité de vie des patients<sup>132</sup>.

C'est pourquoi d'autres stratégies alternatives ont été développées. Certaines ont pour objectif de modifier le FVIII pour en allonger la demi-vie (ajout d'un fragment Fc, PEGylation ou FVIII monocaténaire)<sup>104</sup>. Cependant, l'augmentation de la demi-vie du FVIII est limitée par la demi-vie de sa protéine chaperonne, le vWF. Ainsi, d'autres stratégies n'utilisant pas de FVIII sont utilisées. Cela comprend l'utilisation d'agents court-circuitant le FVIII dans la cascade de la coagulation (FVIIa, concentrés de protéines du complexe prothrombinique activé - aPCC) ou encore l'utilisation d'inhibiteurs des régulateurs naturels de cette cascade que sont la aPC, le TFPI, ou l'antithrombine.

Plus récemment, un anticorps bispécifique, reconnaissant le FIXa et le FX a été approuvé aux Etats-Unis sous le nom d'Hemlibra®. Cette molécule permet le rapprochement spatial des deux molécules, remplaçant le rôle de co-facteur du FVIII et permettant l'activation du FX par le FIXa<sup>106</sup>. En parallèle, la thérapie génique a subi de nombreuses améliorations et montre désormais des résultats très encourageants. Cependant, elle est toujours confrontée à des difficultés, notamment la préexistence chez presque une personne sur cinq, d'anticorps anti-adenovirus associated vector (AAV), le vecteur viral utilisé dans la majorité des thérapies géniques. De plus, la difficulté de contrôle de l'insertion dans le génome constitue toujours une limite de cette stratégie.

L'objectif de ce projet a été de proposer et de valider une nouvelle stratégie alternative à la thérapie de substitution utilisant un ARNm transcrit *in vitro* (IVT mRNA) codant pour le FVIII. Les ARNm présentent les avantages, d'une part, de ne pas avoir à s'intégrer dans le génome et, d'autre part, qu'il existe des mécanismes physiologiques de régulation de leur expression. Ils constituent donc une alternative très intéressante à la thérapie génique et aux thérapies de substitution.

Les ARNm, découverts au début des années 1960, ont depuis été utilisés dans de nombreuses stratégies thérapeutiques. Ainsi peut-on déterminer trois contextes majeurs dans lesquels ils constituent un outil thérapeutique : les immunothérapies dans les cancers, la vaccination et les thérapies de remplacement. Pour stimuler le système immunitaire et ainsi lutter contre le développement tumoral, la possibilité de réinjecter ses DC au patient après les avoir transfectés avec des ARNm *ex vivo*, ou alors d'injecter directement l'ARNm au patient, a été étudiée. Concernant le traitement *ex vivo*, des patients atteints de mélanomes avancés (stades III et IV) ont ainsi développé des lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>), après injection de DC transfectés avec des ARNm codant des antigènes associés aux tumeurs (gp120 et la tyrosinase). Ces lymphocytes, spécifiques de ces antigènes, produisent de l'IFN $\gamma$  lorsqu'ils sont stimulés *in vitro*<sup>334</sup>. D'autres travaux ont également conduit à la mise en place de nombreux essais cliniques de phase I, comme par exemple dans le traitement du cancer de la prostate, du carcinome rénal ou du neuroblastome<sup>335</sup>. Dans le cadre de la leucémie myéloïde aigue, l'injection intradermale de DC transfectées avec un ARNm codant pour la Wilms' tumor 1 protein (WT1) a permis une rémission complète chez 2 patients sur dix<sup>336</sup>. La rémission complète a été définie comme une absence de blastes dans le sang et <5% dans la moelle. Concernant le traitement du mélanome, l'utilisation d'ARNm codant quatre antigènes associés aux tumeurs (Tumor-Associated Antigen – TAA) est également évaluée<sup>337</sup>. Toujours pour traiter le mélanome, des DC ont été transfectés avec les ARNm issus de la tumeur du patient (ARNm autologues), permettant ainsi une personnalisation du traitement et une présentation des peptides spécifiques à chaque patient<sup>338,339</sup>. Cette thérapie personnalisée a également fait l'objet d'un essai clinique de phase I<sup>340</sup>. Concernant l'immunothérapie dans le cancer par injection directe d'ARNm, l'efficacité de la stratégie a également été évaluée lors de nombreux essais cliniques<sup>341</sup>. Des ARNm ont par exemple

été utilisés dans le cancer de la prostate où les patients ont été traités avec des ARNm codant pour quatre TAA spécifiques de cet organe (prostate-specific antigen – PSA -, prostatespecific membrane antigen – PSMA -, prostate stem cell antigen – PSCA - et six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 - STEAP1 -). Une réponse immunitaire a été détectée chez 79% des patients traités avec ces ARNm, dirigée contre les antigènes transgéniques pour 45% d'entre eux<sup>342</sup>. Si un essai de phase III a été lancé dans le cadre du carcinome rénal<sup>343</sup>, il a été arrêté en avril 2018 pour manque d'efficacité.

Concernant l'utilisation des ARNm pour la vaccination contre des maladies infectieuses, ils servent dans ce cas à produire des antigènes d'un pathogène afin de créer une réponse immunitaire spécifique contre ce pathogène. La première étude dans ce contexte a été faite en utilisant un ARNm codant pour la protéine Hsp65 de *Mycobacterium leprae*<sup>344</sup>. L'administration par voie intranasale de cet ARNm a permis la capture des ARNm par les CPA du poumon et la protection de souris contre une infection par *M. tuberculosis* pendant 4 semaines. Dans le cas de la grippe saisonnière, l'utilisation d'ARNm codant pour l'hémagglutinine grippale a permis le développement d'une réponse immunitaire et la protection chez la souris<sup>345</sup>. Dans cette même étude, il a suffi de 8 jours seulement pour développer un vaccin efficace contre la souche H7N9, une fois les séquences des gènes codant l'hémagglutinine et neuraminidase de cette souche publiées. Des études ont également été menées dans le cadre du VIH. En effet, une thérapie nommée « AGS-004 » a été développée et consiste en des DC transfectés avec des ARNm autologues codant pour CD40L et quatre antigènes du HIV (Gag, Vpr, Rev et Nef). Cette thérapie vise à promouvoir et amplifier la génération de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du HIV dans la phase de l'infection où il y a une génération naturelle de ces cellules et un déclin viral<sup>346</sup>. Si l'utilisation de cette thérapie, en combinaison avec un traitement antirétroviral, a permis le développement de CD8<sup>+</sup> chez 7 patients sur neuf<sup>347</sup>, cela ne s'est pas traduit, lors d'un essai clinique de phase II, par une baisse de la charge virale à long terme<sup>348</sup>. Par ailleurs, un ARNm codant pour les chaînes légère et lourde d'un anticorps neutralisant du HIV (le VRC01) a été utilisé chez des souris humanisées pour les cellules lymphoïdes<sup>349</sup>. L'utilisation de cet ARNm *in vivo* a permis d'obtenir des taux d'anticorps 1,65 fois plus importants qu'en injectant 600 µg de l'anticorps, ainsi qu'une protection des souris pendant 2 semaines après infection au HIV.

A nouveau, l'utilisation de cellules transfectées avec des ARNm a ouvert la voie à l'utilisation des ARNm en alternative aux thérapies de remplacement. Ainsi, des monocytes transfectés avec des ARNm codant l'IL-10 et des DC synthétisant de l'IL-4 ont montré des résultats prometteurs dans des modèles murins de myocardite autoimmune et de diabète autoimmun, respectivement<sup>350,351</sup>. La preuve de concept quant à l'utilisation d'ARNm encapsulé dans des nano-particules lipidiques (Lipid Nano-Particules - LNP) a été donnée dans le cas de l'érythropoïétine (EPO)<sup>331</sup>. Dans cette étude, l'injection de 0,1 µg d'ARNm codant l'EPO a des souris ou des singes permettait une augmentation des taux d'EPO, ainsi qu'une présence dans le plasma cinq fois plus longue qu'après administration de 3 µg de protéine. Plus récemment, l'injection d'un ARNm codant le FIX et formulé dans des LNP nommés LUNAR ont permis une production de FIX chez des souris déficientes en FIX<sup>352</sup>. Dans cette étude, les ARNm n'ont pas permis une présence du FIX pendant plus longtemps que la protéine, en revanche et de manière intéressante, des injections répétées d'ARNm ne semblent pas déclencher de réponse immunitaire anti-FVIII. Si les auteurs ne signalent aucune perte d'activité FIX, ni aucune perte de poids des animaux au cours des injections, les anticorps anti-FIX n'ont pas été quantifiés. Ainsi, cela laisse espérer une absence de réponse anti-FIX.

Pour évaluer la faisabilité de cette stratégie dans le cadre du FVIII, j'ai utilisé des IVT mRNA codant pour différents FVIII, codon-optimisés ou pas. Après avoir validé la production de FVIII in vitro après transfection, j'ai injecté par voie intraveineuse des souris déficientes en FVIII avec différentes doses d'ARNm et quantifié la production de FVIII endogène pendant 72h. Par immunofluorescence, j'ai ensuite confirmé l'accumulation de FVIII à proximité des macrophages métallophiliques de la zone marginale de la rate, validant ainsi des observations faites avec du FVIII thérapeutique<sup>223</sup>. Enfin, j'ai validé la correction du phénotype hémorragique par une unique injection d'ARNm. Pour cela, 24h après l'injection, j'ai sectionné le bout de la queue des souris et évalué le volume de sang perdu pendant 20 min.

L'ensemble de mes résultats montre qu'une unique injection d'ARNm chez la souris permet une production de FVIII endogène pendant 72h, 6 fois plus importante que la quantité de FVIII injectée lors de thérapie substitutive. La demi-vie estimée atteint alors 17,9h. Par ailleurs, cette simple injection permet de maintenir pendant 72h des taux de

FVIII >5% du taux normal de FVIII, seuil qui permet de réduire le nombre d'arthropathies annuel de plus de 80%<sup>353</sup>. De plus, cette unique injection d'ARNm permet une correction totale du phénotype hémorragique chez la souris à 24h. Cette étude ouvre la voie à l'utilisation des ARNm pour la production endogène de protéines, même caractérisées par de très faibles taux de traduction, comme le FVIII.

Par ailleurs, la complication la plus redoutée lors du traitement avec du FVIII est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII. La production endogène de FVIII permet un profil de glycosylation endogène. Il a été montré que ces glycosylations sont un facteur important pour le développement de la réponse immunitaire<sup>354</sup>. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le FVIII traduit à partir des ARNm serait moins immunogène que le FVIII thérapeutique. Or, il s'avère que des expériences complémentaires montrent une immunogénicité exacerbée chez les souris injectées avec l'ARNm (présentées à la suite de l'article soumis). Il a été démontré que les modifications apportées à l'ARNm lors de sa production, ainsi que le processus de purification permettent d'éviter l'activation de la réponse innée via les TLRs<sup>355-357</sup>. Nous pensons donc que le FVIII lui-même peut être source d'immunogénicité et allons utiliser des ARNm codant pour des FVIII moins immunogènes<sup>160</sup>. La seconde source possible d'immunogénicité est le vecteur utilisé dans cette étude, à savoir les LNP. Nous avons utilisé ici le TransIT, des LNP développées pour la transfection in vitro et dont nous avons modifié l'utilisation pour une efficacité in vivo. Ces constructions lipidiques peuvent être source d'immunogénicité<sup>358</sup> et pourraient dans le cas du FVIII causer une cytotoxicité, engendrant la production de signaux de danger (voir au paragraphe « Intensité du traitement »). Nous envisageons donc d'utiliser d'autres vecteurs, offrant en plus la possibilité de cibler certains types cellulaires en couplant ces particules à des protéines spécifiques de ces cellules<sup>359</sup>. Enfin, nous envisageons de cibler le foie en incorporant une séquence cible d'un micro ARN (miRNA) inhibant toute production dans les cellules hématopoïétiques<sup>360</sup>.

Correction of bleeding in experimental severe hemophilia A by systemic delivery of factor VIII-encoding mRNA

Short title: mRNA-based therapy for hemophilia A

Scientific category: Thrombosis and Hemostasis

Jules Russick<sup>1,2,3</sup>, Sandrine Delignat<sup>1,2,3</sup>, Peter Milanov<sup>4</sup>, Olivier Christophe<sup>5</sup>, Gabor Boros<sup>6</sup>, Katalin Kariko<sup>6</sup>, Srinivasa Kaveri<sup>1,2,3</sup>, Sébastien Lacroix-Desmazes<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; <sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 1138, Paris, France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 1138, Paris, France; <sup>4</sup>DRK-Blutspendedienst, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main, Germany; <sup>5</sup>INSERM UMR 1176, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France; <sup>6</sup>BioNTech Corporation, An der Goldgrube 12, 55131 Mainz, Germany

Address correspondence to: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France. Email: Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count: Abstract: 246; Text: 2968; Figures: 4; Supplementary figures: 0; References: 42



### Key points

1. Systemic delivery of *in vitro* transcribed FVIII-encoding mRNA to FVIII-deficient mice allows the endogenous production of procoagulant FVIII
2. FVIII levels above 5% of normal plasma levels were maintained for upto 72 hrs and corrected the bleeding phenotype in a tail clipping assay

### Abstract

The treatment or prevention of bleeding in patients with hemophilia A rely on replacement therapy with different factor VIII (FVIII) containing products or on the use of by-passing agents, i.e., activated prothrombin complex concentrates or recombinant activated factor VII. Emerging approaches include the use of bispecific anti-factor IX/factor X antibodies, anti-Tissue Factor Pathway Inhibitor antibodies, interfering RNA to antithrombin or gene therapy. The latter strategies however meet with short term clinical experience and potential adverse effects including the absence of tight temporal and spatial control of coagulation or risk for uncontrolled insertional mutagenesis. The systemic delivery of mRNA allows the endogenous production of the corresponding encoded protein. Thus, injection of lipid nanoparticles-formulated erythropoietin-encoding mRNA resulted in increased erythropoiesis in mice and macaques. Here, we demonstrate that a single injection of *in vitro* transcribed FVIII-encoding mRNA to FVIII-deficient mice allows the endogenous production of pro-coagulant FVIII at levels greater than 5% of normal circulating FVIII levels for up to 72 hours, with an estimated half-life of FVIII production of 17.9 hours. The amount of FVIII produced over 72 hours was 6-fold greater than that injected at once in regular replacement therapy. The endogenously produced FVIII corrected the bleeding phenotype in a tail clipping assay. Taken together, our results suggest that the administration of mRNA is a plausible strategy for the endogenous

production of proteins characterized by poor translational efficacy and encourage the development of improved mRNA delivery systems to foster the yields of FVIII production *in vivo*.

**Keywords:** Hemophilia A, factor VIII, in vitro transcribed mRNA, mRNA therapy

### Introduction

Hemophilia A is a rare X-linked hemorrhagic disorder that results from insufficient plasma levels of pro-coagulant factor VIII (FVIII).<sup>1</sup> Replacement therapy using exogenous FVIII is to date the most efficient strategy to treat or prevent bleeds. It is however extremely expensive owing to the elevated production costs and short half-life of therapeutic FVIII and need for life-long treatment. Several alternative strategies to correct bleeding include the use of FVIII bypassing agents, such as activated prothrombin complex concentrates (aPCC), recombinant factor VIIa (rFVIIa) or monoclonal FVIII-mimicking bispecific antibodies,<sup>2</sup> the injection of anti-Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)<sup>3</sup> or of interfering RNA to antithrombin (AT),<sup>4</sup> and gene therapy.<sup>5</sup> Each of these promising therapies has however intrinsic challenges that may limit broad application at term.

The *in vivo* production of proteins following the administration of mRNA was demonstrated in the early 90's in the case of luciferase and beta-galactosidase,<sup>6</sup> leading to the first clinical trial with mRNA a decade later.<sup>7</sup> Concomitantly, both double and single stranded RNA were found to trigger innate immunity upon ligation of TLR3, 7 and 8, and RIG-1.<sup>8-11</sup> The replacement of uridines by 1-methylpseudouridines and the removal of RNA dimers by HPLC was demonstrated to abrogate the activation of innate immune cells,<sup>12,13</sup> and allowed the *in vivo* production of different proteins including erythropoietin, factor IX and anti-HIV antibodies without the induction of overt neutralizing immune responses.<sup>14-17</sup> The administration of synthetic mRNA was also used in vaccination strategies either by direct injection<sup>18</sup> or upon adoptive transfer of *ex vivo* transfected dendritic cells.<sup>19,20</sup>

Because of its monogenic nature and of the low amounts of FVIII needed to correct the bleeding phenotype of the patients, hemophilia A is a particularly suitable disease for treatment with mRNA. Furthermore, transfection with mRNA is by essence not integrative, and thus avoids risks of uncontrolled insertional mutagenesis that may occur in regular gene therapy

approaches. In addition, mRNA is only transiently active and is degraded by physiological pathways, thus ensuring its safety and facilitating the control of the bio-availability of the encoded protein. Here, we validated that the intravenous administration of FVIII-encoding mRNA allows the production of therapeutic levels of pro-coagulant FVIII in FVIII-deficient mice.

### **Material and Methods**

#### **Cloning of FVIII**

The cDNA encoding human B domain-deleted (BDD) FVIII (FVIII<sup>HSQ</sup>), containing the 14-amino acid segment SFSQNPPVLKRHR in place of the B domain, cloned in the ReNeo mammalian expression plasmid with a geneticin resistance, has been described previously.<sup>21</sup> Codon optimization of the DNA sequence encoding human BDD-FVIII was adapted to the bias of Homo sapiens using an in-house proprietary software (GeneOptimizer) from GeneArt (Thermo Fisher, Darmstadt, Germany). The GeneOptimizer software also calculates removal of cis-acting sequence motifs, including internal TATA-boxes, chi-sites and ribosomal entry sites, AT- or GC-rich sequence stretches, AU-rich elements, inhibitory and cis-acting repressor sequence elements, repeat sequences, RNA secondary structures, and all cryptic splice sites. The codon optimized BDD-FVIII-encoding cDNA was also cloned in the ReNeo vector.

#### ***In vitro* transcription of mRNA**

mRNAs were transcribed as previously described<sup>22</sup> using the linearized plasmids encoding BDD-FVIII (FVIII<sup>HSQ</sup>), the codon-optimized BDD-FVIII (CoFVIII<sup>HSQ</sup>) and firefly luciferase (Luciferase). The Megascript T7 RNA polymerase kit (Thermo Fisher) was used for transcription, and UTP was replaced with 1-methylpseudouridine triphosphate (m1ΨTP; TriLink, San Diego, CA) to generate m1Ψ-containing mRNA. All mRNAs were transcribed to

contain 100-nt long poly(A) tails. To obtain cap1, RNA was incubated with guanylyltransferase and 2'-*O*-methyltransferase (Vaccinia capping system; New England Biolabs, Frankfurt). All mRNAs were purified and stored at -20°C.

### ***In vitro* transfection**

For transient *in vitro* production of FVIII, baby hamster kidney (BHK) cells (0.5 million cells in 48-well plates) were transfected with FVIII<sup>HSQ</sup> or CoFVIII<sup>HSQ</sup> cloned in the ReNeo vector (0.1 µg) using lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For *in vitro* transfection using mRNA, mRNA (0.4 µg) was mixed with TransIT®-mRNA reagent (0.45 µl, Mirus Bio, Madison, WI, USA) and Boost reagent (0.29 µl) in a final volume of 50 µl of Dulbecco's Modified Eagle's Medium for 2 min at room temperature. HEK293 cells (50.000 cells/130 µL) were incubated with the formulated mRNA overnight in DMEM-F12 (DMEM-F12, Thermo Fisher). FVIII was measured in the supernatant after 24 hours. Supernatant was kept frozen at -80°C until use.

### **Treatment of mice**

Mice were 8 to 12-week-old FVIII exon 16 knock-out C57BL/6 mice. Mice were injected intravenously with recombinant BDD-FVIII (rFVIII, Refacto®, Pfizer, 150 IU/kg), or with mRNA (1 to 5 µg) formulated in TransIT® (100 to 350 µL final volume). Blood was collected from retro-orbital sinus 6, 24, 48 or 72 hours following the injection of mRNA. Plasma was kept frozen at -80°C until use. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (Comité Charles Darwin, ethical authorization #3335 2015121718044892).

### **Quantification of FVIII antigen (FVIII:Ag)**

96-well ELISA plates (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific) were coated with a mouse monoclonal anti-C2 domain IgG (ESH-8, Sekisui Diagnostics, Kings Hill, Kent, UK) at 1 µg/mL in bicarbonate buffer pH 9.5 for 1 hour at 37°C. Wells were saturated using 3% bovine serum albumin (BSA) in 20 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20. Serial dilutions of plasma or cell culture supernatants in 20 mM Hepes pH 7.4, 600 mM NaCl, 0.05% tween 20 were incubated for 1 hour at 37°C. FVIII was detected using a mouse monoclonal biotinylated anti-A2 domain antibody (GMA 8015, Green Mountain Antibodies, Burlington, VT, USA) and revealed by streptavidin-horse radish peroxidase (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and its 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate (eBioscience, Thermo Fisher Scientific). A standard pool of human plasma (Siemens, Marburg, Germany) was used as standard.

### **Quantification of FVIII activity (FVIII:C)**

FVIII:C was measured in culture supernatant or in mouse plasma using a FVIII chromogenic Assay (Siemens) and using pooled human plasma as a standard. Apparent specific activities were calculated by dividing the FVIII:C by FVIII:Ag for each individual plasma/supernatant.

### **Luciferase detection**

Wild-type 8 week-old Balb/c males (Janvier, Saint-Berthevin, France) were injected intravenously with 5 µg of luciferase-encoding mRNA formulated in TransIT®, and 24 hours later with 225 mg/kg luciferin. After 10 min, luminescence was detected using an In Vivo Imaging System (Lumina II, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Images were acquired and analyzed by Living Image® 4.4 software (PerkinElmer).

### **Immunofluorescence**

FVIII-deficient mice injected intravenously with 3 µg of CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding-mRNA or 3 µg of rFVIII were sacrificed 24 hours or 30 min after injection, respectively. At the time of sacrifice, blood was removed by flushing cold PBS into the heart of mice. The spleens were frozen in Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific). Serial cryosections (10 µm) were air-dried and fixed with acetone for 10 min. The sections were incubated with a polyclonal sheep anti-FVIII antibody (CoaChrom Diagnostica, Enzersdorf, Austria) in Antibody Diluent Reagent Solution (Invitrogen) for 2 hours at room temperature. An anti-sheep secondary antibody coupled with Alexa Fluor 647 fluorochrome (Invitrogen) in Antibody Diluent Reagent Solution was then added for 1 hour at room temperature, followed by addition of an anti Siglec-1 antibody conjugated to FITC (Serotec, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) overnight. Following staining of nuclei using Hoechst (Invitrogen), slides were mounted using ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen). Images were acquired using an Observer Z1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with Illuminator HXP120 (Zeiss). Digital images were captured with Zen software (Zeiss) and analyzed with Adobe Photoshop V.CS3 (Adobe, Dublin, Ireland).

### **Bleeding time**

FVIII-deficient mice were injected intravenously with 3 µg of FVIII-encoding mRNA, 1.2 or 3 IU of rFVIII or PBS as a negative control. Mice were anesthetized with Ketamine/Xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively), and 3 mm of the distal tail were cut using a scalpel. The amputated tail was immersed immediately in physiologic saline solution at 37°C, and blood was collected for 20 min. The blood was then centrifuged at 3000 g for 15 min and red blood cells pellets were lysed in water for 15 min. The absorbance of released hemoglobin was

measured at 416 nm. The corresponding volume of blood lost was calculated using a standard curve prepared by lysing red blood cells prepared from known volumes of mouse blood.



## Results

### Codon-optimization of cDNA encoding FVIII<sup>HSQ</sup> improves *in vitro* FVIII production

We first investigated whether codon-optimization of FVIII<sup>HSQ</sup> improves the production of FVIII by BHK transfected cells. To this end, the codon-optimized cDNA encoding B domain-deleted FVIII (CoFVIII<sup>HSQ</sup>) was synthesized and inserted in the Reneo vector. BHK cells were transiently transfected with 0.1 µg FVIII<sup>HSQ</sup> or CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding cDNA (Figure 1A). FVIII:Ag and FVIII:C were measured in the supernatant 24 hours later by ELISA and chromogenic assay. Transfection with CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding cDNA produced 4.2-fold more FVIII:Ag (0.059±0.013 AU vs 0.014±0.003 AU, respectively, P<0.01) and 4.8-fold more FVIII:C (0.135±0.035 AU vs 0.028±0.013 AU, respectively, P<0.01), than transfection with the non-optimized FVIII<sup>HSQ</sup>-encoding cDNA. Our data confirm previous findings obtained upon gene therapy in preclinical models of hemophilia A,<sup>23,24</sup> on the capacity of codon optimization to increase the yields of FVIII production.

### Transfection with FVIII-encoding mRNA leads to FVIII production *in vitro*

We then validated the capacity of mRNA transcribed *in vitro* using the FVIII<sup>HSQ</sup> and CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding cDNA as templates, to promote FVIII production. As the codon-optimization is for Homo Sapiens, human HEK293 cells were transfected with mRNA encoding FVIII<sup>HSQ</sup> or CoFVIII<sup>HSQ</sup> formulated in TransIT® (Figure 1B). As a negative control, HEK293 cells were transfected with luciferase-encoding mRNA. Transfection with the two FVIII-encoding mRNA lead to the *in vitro* production of FVIII, although to similar amounts (0.16±0.02 IU/mL vs 0.20±0.02 IU/mL for FVIII<sup>HSQ</sup> and CoFVIII<sup>HSQ</sup>, respectively) and similar activities (0.20±0.01 IU/mL vs 0.24±0.02 IU/mL, respectively). Accordingly, the specific activity of FVIII produced using both mRNA did not differ (1.32±0.11 and 1.23±0.15,

respectively), suggesting that codon optimization has no beneficial effect on the production of FVIII when cells are transfected with mRNA, in our experimental system.

### **Systemic delivery of FVIII-encoding mRNA to FVIII-deficient mice leads to the endogenous production of FVIII**

FVIII-deficient mice were injected intravenously with 1 µg of FVIII<sup>HSQ</sup> or CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA formulated in TransIT® (Figure 2A). Plasma levels of FVIII:Ag and FVIII:C, measured after 24 hours, were  $0.57 \pm 0.08$  IU/mL and  $0.42 \pm 0.15$  IU/mL in the case of FVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA, and  $0.61 \pm 0.23$  IU/mL and  $0.27 \pm 0.11$  IU/mL in the case of CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA. Likewise, the specific activities of FVIII<sup>HSQ</sup> and CoFVIII<sup>HSQ</sup> did not differ significantly:  $0.73 \pm 0.31$  and  $0.36 \pm 0.09$ , respectively. The endogenous production of FVIII was then followed over 72 hours after the injection of 1, 3 or 5 µg of CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA. At 24 hours (Figure 2B, left panel), there was a non-significant dose-dependency between the dose of mRNA injected and the levels of FVIII:C reached in the circulation, ranging from  $0.27 \pm 0.11$  to  $0.42 \pm 0.14$  IU/mL. Interestingly, the mean residual FVIII activity 72 hours after the injection of 3 and 5 µg of mRNA (Figure 2B, central panel), was above 5% of the theoretical FVIII:C in normal plasma ( $0.06 \pm 0.02$  IU/mL and  $0.11 \pm 0.03$  IU/mL, respectively).

We then estimated the total amount of FVIII produced over 72 hours following injection of FVIII-encoding mRNA. To this end, mice were injected intravenously either with 3 IU of human rFVIII or with 3 µg of CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA formulated in TransIT® (Figure 2C, right panel). The areas under the curves depicting the changes in FVIII plasma levels over time were 2.9 and 17.8 IU/mL\*hours, respectively, showing that the injection of 3 µg of mRNA allows the endogenous production over a period of 72 hours of amounts of FVIII 6-fold greater than the amount of rFVIII injected at once. The half-life of rFVIII in the circulation was fitted using a two-phase decay equation: short and long half-lives of 0.9 and 4.7 hours were

calculated. The apparent half-life of production of CoFVIII<sup>HSQ</sup> was calculated by fitting the FVIII:C levels measured at 24, 48 and 72 hours with a one-phase decay equation: it was 17.9 hours.

### **Bio-distribution of the mRNA-encoded protein**

We first detected the site of production of luciferase in wild-type Balb/c mice 24 hours after the injection of luciferase-encoding mRNA. Visualization of the mice by IVIS 10 minutes after the injection of luciferin indicated endogenous luciferase production in 5/5 mice (Figure 3A). Measurement of luciferase activity on individual organs demonstrated production in the liver and the spleen (Figure 3B) but not in the kidneys, lungs, heart, muscle or brain (not shown). We then attempted to detect FVIII by immunohistochemistry in spleen sections from FVIII-deficient mice injected with CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA formulated in TransIT®. As controls, FVIII-deficient mice were not injected or were injected with rFVIII. Unlike luciferase, FVIII is secreted in the circulation. Mice were therefore injected with ice-cold PBS at the time of sacrifice to remove circulating FVIII. While no FVIII was detected in spleens from untouched mice (Figure 3C), intravenously administered rFVIII accumulated in the marginal zone (MZ) of the spleens at the level of siglec-1-positive metallophilic macrophages within 30 minutes of injection, as shown previously.<sup>25</sup> FVIII produced endogenously following injection of mRNA was also detected at the level of MZ metallophilic macrophages at 24 hours. FVIII was not detected in liver sections (data not shown).

### **Correction of the bleeding phenotype of FVIII-deficient mice by the endogenously produced FVIII**

We then investigate the effect of a single injection of FVIII-encoding mRNA on the bleeding phenotype of FVIII-deficient mice. FVIII-deficient mice were injected with PBS, with 3 µg

FVIII<sup>HSQ</sup>-encoding or CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA or with 1.2 or 3 IU rFVIII (Figure 4). The tip of the mouse tails was clipped after 30 minutes in the case of rFVIII or after 24 hours in the case of PBS or mRNA, and blood loss was followed over 20 min. While the PBS-injected mice lost  $274.30 \pm 53.39$   $\mu$ L of blood, injection of rFVIII protected the mice from major bleeding with blood loss of  $86.0 \pm 44.9$   $\mu$ L and  $12.2 \pm 0.9$   $\mu$ L for 1.2 IU ( $P < 0.05$ ) and 3 IU ( $P < 0.001$ ) rFVIII, respectively. Interestingly, mice injected with FVIII-encoding mRNA lost  $45.8 \pm 24.6$   $\mu$ L of blood ( $P < 0.001$  as compared to PBS-treated mice), showing correction of the bleeding phenotype.

### Discussion

The present work documents the endogenous production of pro-coagulant FVIII following the injection of FVIII-encoding mRNA into FVIII-deficient mice. FVIII levels achieved 24 hours after the injection of mRNA were about 40% of the levels in normal plasma. The expression levels of FVIII are notoriously low owing to poor transcriptional and translation efficacies<sup>26-28</sup> as well as retention of the protein in the ER.<sup>29,30</sup> Attempts to improve the levels of expression of FVIII include the partial removal of the B domain with conservation of essential N-glycosylation sites,<sup>23,30</sup> mutation of a BiP binding site<sup>31</sup> to ensure improved transfer from ER to Golgi,<sup>32</sup> removal of the furin cleavage site to generate a single chain molecule<sup>33,34</sup> and codon optimization. In the present work, mRNA was generated using wild-type<sup>21</sup> or codon optimized cDNA encoding human BDD-FVIII. While codon optimization improved FVIII production following transfection of eukaryotic cells with plasmid DNA *in vitro*, it did not increase the levels of FVIII:C or FVIII:Ag following *in vitro* mRNA transfection of cells or *in vivo* transfection of FVIII-deficient mice. Codon optimization aims at improving translation rates by using codons for which the cognate tRNA levels are not limiting. Thus, codon optimization of FVIII-encoding cDNA cloned in lentiviral vectors or adenoviral-associated vectors was shown to lead to more than 10-fold increased FVIII levels after *in vitro* transfection of cell lines and after injection to wild-type or FVIII-deficient mice<sup>23,24</sup>. The lack of improvement in protein production associated with the administration of codon optimized mRNA encoding FVIII suggests that codon optimization of FVIII preferentially targets transcriptional rather than translational events, as previously shown.<sup>35,36</sup> Alternatively, levels of mRNA introduced in each cell upon *in vivo* transfection with TransIT® may be much lower than that transcribed endogenously following transfection using DNA, and insufficient to exhaust non-abundant tRNA. Increasing the amount of mRNA injected *in vivo* had however no significant effect on the FVIII levels reached in the circulation.

Frequent spontaneous joint and muscle bleeds in patients with severe hemophilia A eventually lead to the development of arthropathy and functional joint impairment. An association between joint bleeds and baseline FVIII activity levels was demonstrated<sup>37</sup>, with FVIII levels above 5% of the normal values drastically reducing the occurrence of joint bleeds. Because the half-life of human FVIII in patients with HA is comprised between 12 and 18 hours, ideal prophylactic replacement therapy is the gold standard to maintain healthy joint functions.<sup>38</sup> In FVIII-deficient mice, the half-life of human FVIII is comprised between 4 and 6 hours. Interestingly, delivery of FVIII-encoding mRNA yielded FVIII levels that corrected acute bleeding in a tail clipping assay, and were maintained above 5% for up to 72 hours. The longer residence time of FVIII produced after mRNA delivery as compared to that of recombinant FVIII results from the cumulative lifespans of the transfected mRNA in the cells and of the FVIII released in the circulation. The mRNA-based therapy can be improved by engineering the encoded protein to extend its half-life.<sup>39</sup> Indeed, a novel FVIII molecule with an increased half-life has recently been developed upon fusion of FVIII to the Fc fragment of human IgG1.<sup>2</sup> We anticipate that the use of mRNA encoding long-lasting FVIII glycoproteins will allow a further increase in the duration of FVIII detection *in vivo*.

The delivery of luciferase-encoding mRNA led to the detection of luciferase in the liver and spleen. Using immuno-fluorescence, the FVIII produced endogenously after mRNA delivery was exclusively detected in the MZ of the spleen. However, owing to low levels of FVIII produced and lack of sensitivity of endogenous FVIII detection in tissue sections, it is not clear whether the detection of FVIII in the spleen results from a local production of FVIII or from the accumulation in the MZ of FVIII secreted in the circulation. Growing evidence suggests that microvasculature endothelial cells are the natural site of production of FVIII.<sup>40,41</sup> Further work will indicate whether targeting mRNA delivery to the endothelium using improved lipid nanoparticle-based formulating agents<sup>42</sup> and/or introducing target sequences that have

complimentarily to the hematopoietic-specific microRNA are plausible strategies to improve the levels of FVIII production *in vivo*.

### **Acknowledgment**

This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by a grant from CSL-Behring (Paris, France). JR was the recipient of a fellowship from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. We also would like to thank the staff from the Centre d'Imagerie Cellulaire et Cytométrie platform and Centre d'Expérimentation Fonctionnelle for assistance (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris).

### **Authors contributions:**

JR, KK, SVK and SLD designed the research

JR, SD, PM, OC and GB performed experiments;

JR and SLD analyzed results and made the figures;

JR, OC, KK, SVK and SLD wrote the paper

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

KK and GB are employees of BioNTech.

## References

1. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 2001;344(23):1773–1779.
2. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Efficacy of Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(9):809–818.
3. Chowdhury P, Lethagen S, Friedrich U, et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2015;13(5):743–754.
4. Pasi KJ, Rangarajan S, Georgiev P, et al. Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(9):819–828.
5. Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EGD. Advances in Gene Therapy for Hemophilia. *Hum. Gene Ther.* 2017;28(11):1004–1012.
6. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990;247(4949 Pt 1):1465–1468.
7. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Invest.* 2002;109(3):409–417.
8. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732–738.
9. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004;303(5663):1526–1529.
10. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* 2006;314(5801):994–997.
11. Schlee M, Roth A, Hornung V, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity.* 2009;31(1):25–34.
12. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165–175.
13. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):e142.
14. Karikó K, Muramatsu H, Keller JM, Weissman D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2012;20(5):948–953.
15. Li B, Luo X, Deng B, et al. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* 2015;15(12):8099–8107.
16. Ramaswamy S, Tonnu N, Tachikawa K, et al. Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017;114(10):E1941–E1950.
17. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature.* 2017;543(7644):248–251.
18. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell.* 2017;168(6):1114–1125.e10.
19. Su Z, Dannull J, Heiser A, et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* 2003;63(9):2127–2133.



20. Kyte JA, Kvalheim G, Lislerud K, et al. T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother. CII*. 2007;56(5):659–675.
21. Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, et al. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood*. 1998;92(10):3701–3709.
22. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2008;16(11):1833–1840.
23. McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*. 2013;121(17):3335–3344.
24. Ward NJ, Buckley SMK, Waddington SN, et al. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood*. 2011;117(3):798–807.
25. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2009;7(11):1816–1823.
26. Kaufman RJ, Wasley LC, Davies MV, et al. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 1989;9(3):1233–1242.
27. Lynch CM, Israel DI, Kaufman RJ, Miller AD. Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Hum. Gene Ther.* 1993;4(3):259–272.
28. Hoeben RC, Fallaux FJ, Cramer SJ, et al. Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood*. 1995;85(9):2447–2454.
29. Dorner 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.
30. Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood*. 2004;103(9):3412–3419.
31. Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* 1997;272(39):24121–24124.
32. Zhang B, McGee B, Yamaoka JS, et al. Combined deficiency of factor V and factor VIII is due to mutations in either LMAN1 or MCFD2. *Blood*. 2006;107(5):1903–1907.
33. Siner JI, Samelson-Jones BJ, Crudele JM, et al. Circumventing furin enhances factor VIII biological activity and ameliorates bleeding phenotypes in hemophilia models. *JCI Insight*. 2016;1(16):e89371.
34. Nguyen GN, George LA, Siner JI, et al. Novel factor VIII variants with a modified furin cleavage site improve the efficacy of gene therapy for hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2017;15(1):110–121.
35. Zhou Z, Dang Y, Zhou M, et al. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(41):E6117–E6125.
36. Kudla G, Lipinski L, Caffin F, Helwak A, Zyllicz M. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells. *PLoS Biol.* 2006;4(6):e180.
37. den Uijl IEM, Fischer K, Van Der Bom JG, et al. Analysis of low frequency bleeding data: the association of joint bleeds according to baseline FVIII activity levels. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2011;17(1):41–44.

38. Oldenburg J. Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens. *Blood*. 2015;125(13):2038–2044.
39. Farelli JD, Asrani KH, Isaacs C, et al. Leveraging Rational Protein Engineering to Improve mRNA Therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2018;
40. Shahani T, Lavend'homme R, Luttun A, et al. Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood*. 2010;115(23):4902–4909.
41. Pan J, Dinh TT, Rajaraman A, et al. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood*. 2016;128(1):104–109.
42. Dahlman JE, Barnes C, Khan O, et al. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat. Nanotechnol*. 2014;9(8):648–655.

**Legends to figures**

**Figure 1. *In vitro* production of wild-type and codon-optimized FVIII.** DNA in lipofectamin (0.1  $\mu$ g, panels A) or mRNA formulated in TransIT® (0.4  $\mu$ g, panels B) encoding BDD-FVIII (FVIII<sup>HSQ</sup>) and codon-optimized BDD-FVIII (CoFVIII<sup>HSQ</sup>) were used to transfect BHK (panels A) or HEK293 (panels B) cells. mRNA encoding luciferase was used as a control (panels B). FVIII:Ag (left panels) and FVIII:C (middle panels) were measured in cell supernatant 24 hours after transfection. The right panels depict the specific activities as calculated by dividing the FVIII:C values by the FVIII:Ag values. Statistical differences were assessed using a two-tailed t test (ns: non-significant, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Results are depicted as means  $\pm$  SEM for 3 independent experiments.

**Figure 2. Delivery of FVIII-encoding mRNA allows endogenous production of FVIII.** mRNA encoding BDD-FVIII (FVIII<sup>HSQ</sup>) or codon-optimized BDD-FVIII (CoFVIII<sup>HSQ</sup>) was formulated in TransIT®. FVIII-deficient mice were then injected intravenously with 1  $\mu$ g (panels A) or 1, 3 or 5  $\mu$ g (panels B) FVIII-encoding mRNA. FVIII:Ag and FVIII:C were measured in plasma after 24 and 72 hours. Individual symbols on the graphs represent individual mice; horizontal bars represent means  $\pm$  SEM. The dotted line indicates the critical FVIII level (i.e., 5%) required to drastically reduce joint bleeds. Statistical differences were assessed using a two-tailed t test (ns: non-significant, \*:  $p < 0.05$ ). Panel C. Mice were injected with 3  $\mu$ g CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA formulated in TransIT®, or with 100  $\mu$ l 10 nM recombinant BDD-FVIII (3 IU rFVIII). FVIII:C in plasma was measured after 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 390 and 480 min in the case of rFVIII, and 6, 24, 48 and 72 hours in the case of mRNA. The dotted line depicts the non-linear fit (two-phase exponential decay) of the experimental data obtained with rFVIII. The full circles and full line curve represent

means $\pm$ SEM of 6 mice treated with mRNA (representative of 2 independent experiments). Areas under the curves were calculated using Prism GraphPad (Version 6).

**Figure 3. Detection of mRNA-encoded proteins in mice.** Panels A and B. Five Balb/c mice were injected intravenously with 5  $\mu$ g of luciferase-encoding mRNA formulated in TransIT $\text{\textcircled{R}}$ . The expression of luciferase was measured 24 hours later, following the intravenous injection of luciferin (panel A). Mice were then dissected and the luciferase activity was measured in the spleen, liver, kidneys and lungs. Luminescence was quantified and is expressed as p/sec/cm<sup>2</sup>/sr, where p stands for photon and sr for steradian. Individual mice are depicted as single dots and horizontal bars depict means $\pm$ SEM. Panel C. FVIII-deficient mice were kept untouched (uninjected, upper panels), or injected intravenously with 3  $\mu$ g of rFVIII (middle panels) or with 3  $\mu$ g of CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA formulated in TransIT $\text{\textcircled{R}}$  (bottom panels). Mice were sacrificed 30 min (uninjected and rFVIII) or 24 hours later (FVIII mRNA), and blood was washed-out by injection of ice-cold PBS. FVIII (red, left panels) and siglec-1-positive metallophilic macrophages (green, central panels) were then labeled on histological spleen sections. Nuclei were labeled using Hoechst (Blue) and images were merged (right panels). Data are representative of 2-5 mice. Magnification 40X.

**Figure 4. Injection of FVIII-encoding mRNA corrects acute bleeding in FVIII-deficient mice.** FVIII-deficient mice were injected intravenously with 3  $\mu$ g of FVIII<sup>HSQ</sup>-encoding (empty squares) or coFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA (full circles) formulated in TransIT $\text{\textcircled{R}}$ , with 1.2 IU (empty circles) or 3 IU (full diamonds) recombinant BDD-FVIII (rFVIII) or with PBS (full triangles). Mice tails were clipped 3 mm from the tip, 24 hours after mRNA and PBS injection, or 30 min after rFVIII injection. Bleeding intensity was measured as the volume of blood lost during 20 min. Horizontal bar depict means and individual dots representing individual mice.

Statistical differences were assessed using the double-sided Mann-Whitney test (ns: non-significant).

Figure 1

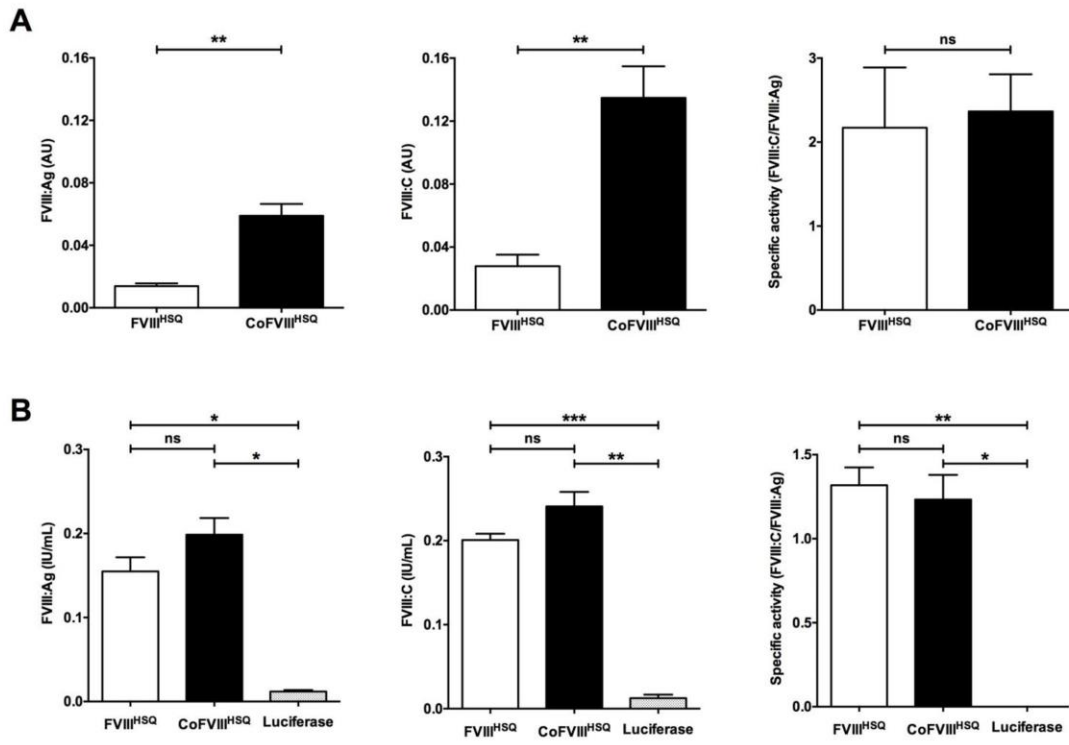


Figure 2

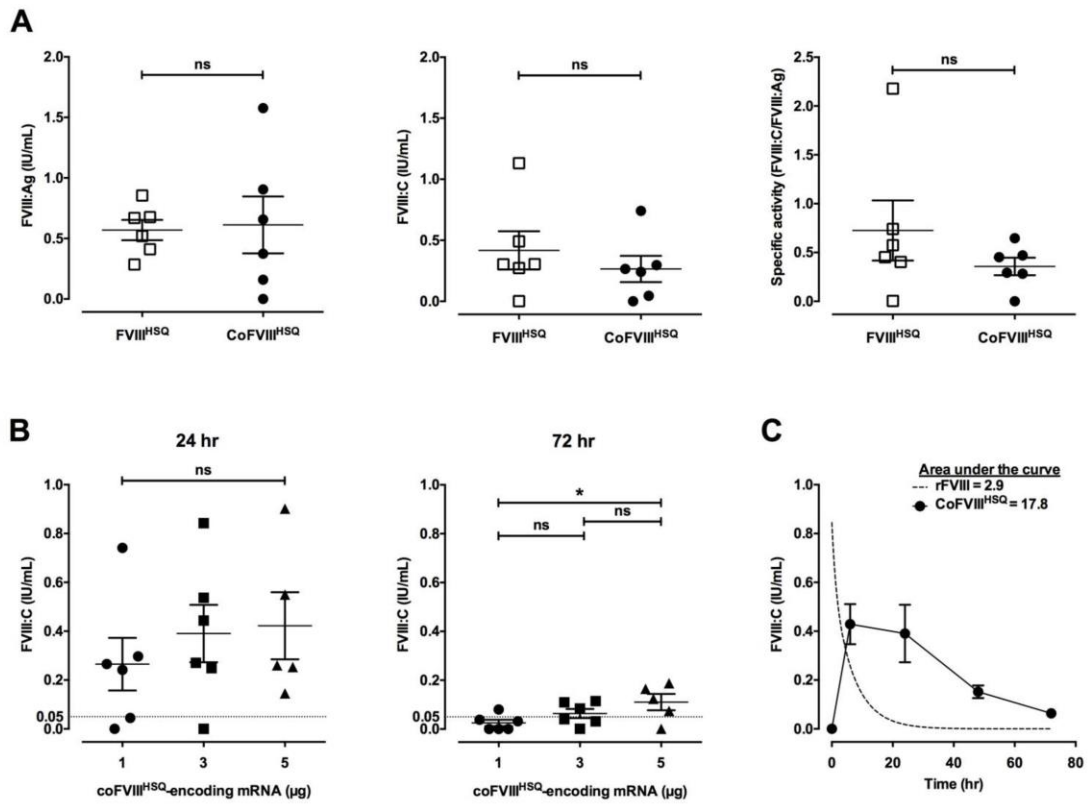
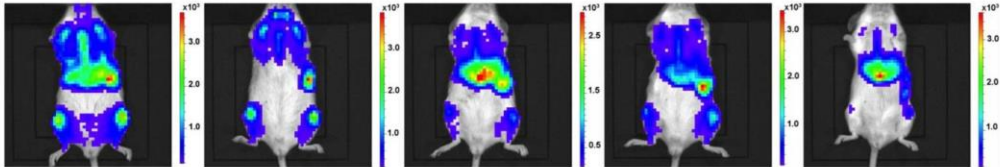
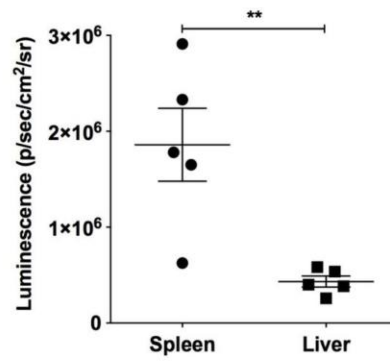


Figure 3

A



B



C

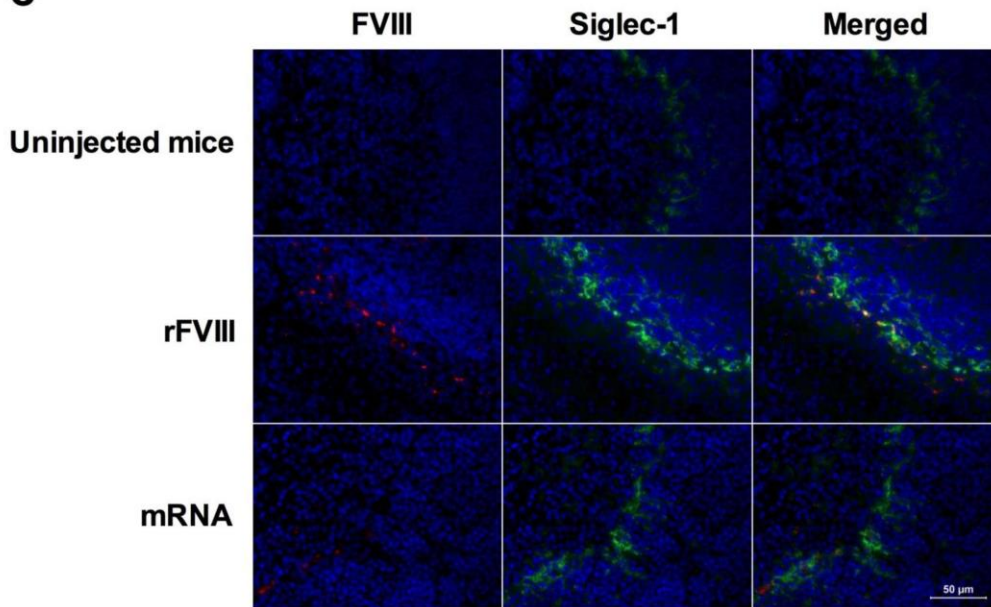
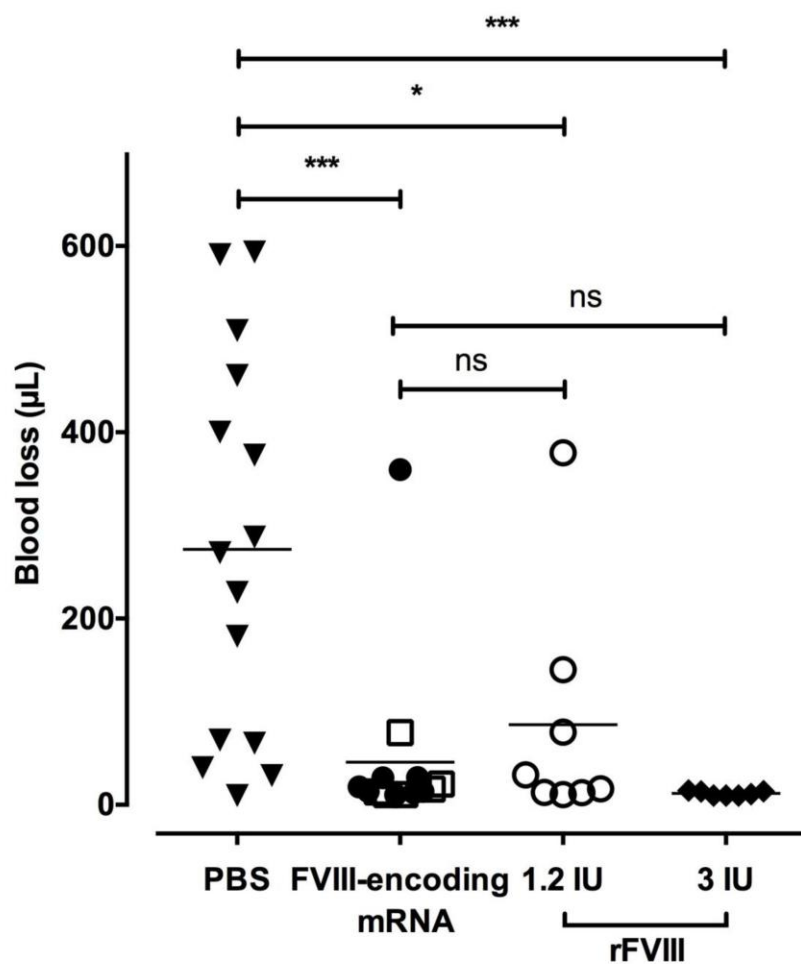




Figure 4



## Résultats supplémentaires

### Methods

#### Titration of anti-FVIII IgG

96-well ELISA plates (Nunc Maxisorp) were coated with recombinant FVIII (Recombinate®, Baxter, Vienna, Australia) at 2 µg/mL in bicarbonate buffer pH 9.5 for 1 hour at 37°C and blocked with PBS-3% BSA. Serial plasma dilutions were then incubated for 1 hour at 37°C. Bound IgG were revealed using a goat horse radish peroxidase-coupled polyclonal anti-mouse IgG (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) and the o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) substrate. The mouse monoclonal IgG mAb6 specific for the heavy chain of FVIII (a gift from Prof. J.M. Saint-Remy, KUL, Belgium) was used as a standard.

#### Titration of FVIII inhibitors

Serial dilutions of mouse plasma were incubated volume to volume with a standard pool of human plasma (Siemens) for 2 hours at 37°C. The residual pro-coagulant FVIII activity was measured using the FVIII Chromogenic assay (Siemens). Bethesda titers, expressed in BU/mL, are defined as the reciprocal of the dilution of plasma that produces 50% residual FVIII activity.

### Résultats

#### Multiple injections of FVIII-encoding mRNA trigger an anti-FVIII immune response

The repeated administration of rFVIII is known to trigger the production of inhibitory anti-FVIII IgG in mice after 3-5 injections.<sup>1</sup> We thus assessed the effect of multiple injections of FVIII-encoding mRNA on the onset of an anti-FVIII immune response. We treated FVIII-deficient mice with 1 µg FVIII<sup>HSQ</sup>-encoding or CoFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA once a week for 7 weeks. As a control, FVIII-deficient mice were injected once a week with 5 IU rFVIII. First, we measured residual plasma FVIII levels 24 hours after rFVIII or mRNA injection (Figures S1A and B). Consistent with the short half-life of FVIII in mice, very low FVIII:Ag and FVIII:C were measured in plasma 24 hours following injection of rFVIII during the first 3 weeks of treatment. In the case of mRNA-treated mice, a sharp decrease in both FVIII:Ag and FVIII:C was observed between the first ( $0.62 \pm 0.13$  IU/mL and  $0.37 \pm 0.11$  IU/mL, respectively) and second ( $0.14 \pm 0.03$  IU/mL and  $0.05 \pm 0.05$  IU/mL, respectively) injections. From the third week of treatment onwards, FVIII:C levels were below detection levels.

We then investigated the presence of inhibitory anti-FVIII IgG by ELISA and using a modified Bethesda assay, 5 days after each administration of mRNA or rFVIII to the mice. As described previously, the intravenous administration of rFVIII induced a progressive increase in levels of anti-FVIII IgG that reached a plateau after 5 injections ( $10168 \pm 4501$  AU after 7 injections, Figure S1C). This was mirrored by a gradual increase in levels of FVIII inhibitors, that crossed 10 BU/mL 5 days after the fourth injection to plateau at  $111 \pm 79$  BU/mL (Figure S1D). In the case of FVIII-encoding mRNA, levels of anti-FVIII IgG as high as those obtained after 5 injections of rFVIII were detected as early as 5 days following the second treatment. The plateau after 7 weeks of treatment ( $98060 \pm 8251$  AU) was 10-fold higher in the case of mRNA than in that of rFVIII. Likewise, while no FVIII inhibitory activity was detected 5 days after the first injection of mRNA, levels of  $383 \pm 196$  BU/ml were generated 5 days after the second injection, which gradually increased to reach a plateau at  $2258 \pm 669$  BU/mL after 7 weeks of treatment.

The plateau of FVIII inhibitors was thus 20-fold greater in mice treated with mRNA than in mice treated with rFVIII.

### Discussion

In patients with severe HA, inhibitory anti-FVIII IgG (FVIII inhibitors) generally develop within the first 20 cumulated days of exposure to therapeutic FVIII.<sup>2</sup> In the present work, and in agreement with previous studies in FVIII-deficient mice,<sup>3</sup> FVIII-binding IgG and FVIII inhibitors were detected after 2 and 3 intravenous injections of recombinant FVIII, respectively. The levels of anti-FVIII IgG increased to reach a plateau at 10 to 100-fold higher levels after 2 to 3 additional injections of recombinant FVIII. In the case of mRNA administration however, close to maximal levels of FVIII-binding IgG and inhibitory antibodies were reached after only two injections of FVIII-encoding mRNA. Accordingly, the levels of endogenous FVIII:C were undetectable as early as after the second administration of mRNA. Different explanations for such a brisk and intense immune response to the endogenously produced FVIII may be proposed that implicate the very FVIII molecule, the mRNA used for *in vivo* transfection and/or the transfecting agents used to formulate the mRNA.

Several lines of evidence suggest that the produced FVIII itself may be responsible for the sharp anti-FVIII immune response. As explained above, FVIII is a particularly immunogenic glycoprotein: e.g., a fusion protein between the light chain of FVIII and the first domain of hemagglutinin 1 (HA1) demonstrated greater anti-HA1 immunogenicity upon intravenous injection to FVIII-deficient mice than the HA1 molecule alone.<sup>4</sup> In contrast, the production of factor IX was induced in mice following administration of mRNA without report of a neutralizing immune response.<sup>5</sup> Of note, a relationship between the dose of FVIII injected to mice and the kinetics of detection of the anti-FVIII IgG response was reported in mice.<sup>3</sup> This is particularly relevant in view of the fact that the amount of FVIII produced over 72 hours after one injection of FVIII-encoding mRNA is equivalent to 5-6 folds the amount of recombinant FVIII administered in a single injection. The incidence of antibody to human proteins following *in vivo* mRNA transfection has recently been indirectly suggested.<sup>6</sup> Importantly, the mRNA used in the latter work and in our study was engineered to contain 1-methylpseudouridines and HPLC-purified to remove dsRNA, thus abrogating mRNA recognition by TLR3, TLR7, TLR8 and RIG-I.<sup>7-10</sup> It is thus not probable that mRNA plays an adjuvant role in the onset the anti-FVIII immune response. In the present study, we exploited the commercially available TransIT® to formulate the mRNA prior to *in vivo* transfection. In contrast, previous work on *in vivo* mRNA transfection without apparent induction of neutralizing immune responses have used different types nanoparticles.<sup>5,11</sup> Because TransIT® was initially conceived for *in vitro* and not *in vivo* gene transfection, we cannot exclude the possibility that it brings about danger signals that adjuvant the anti-FVIII immune response *in vivo*. Additional work comparing different transfecting nanoparticles should lead to new strategies to prevent the immunogenicity of exogenous mRNA-encoded FVIII in the future.

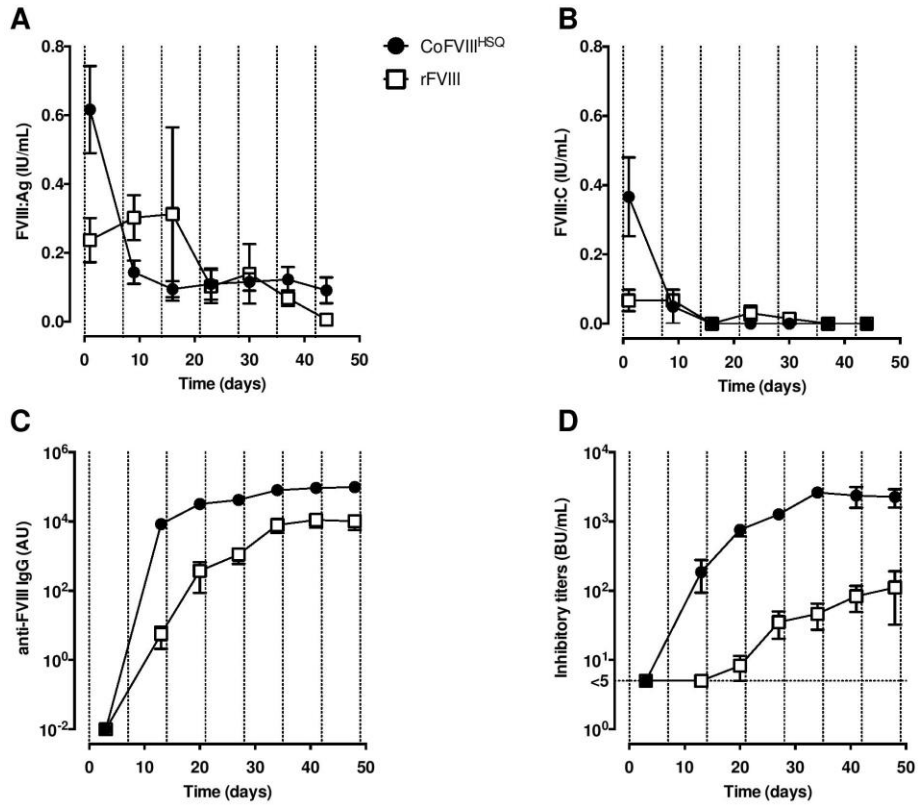
The delivery of luciferase-encoding mRNA led to the detection of luciferase in the liver and spleen. Using immuno-fluorescence, the FVIII produced endogenously after mRNA delivery was exclusively detected in the MZ of the spleen. However, owing to low levels of FVIII produced and lack of sensitivity of endogenous FVIII detection in tissue sections, it is not clear whether the detection of FVIII in the spleen results from a local production of FVIII or from the accumulation in the MZ of FVIII secreted in the circulation. Of note, the spleen is essential to the initiation of the anti-FVIII immune response and the

accumulation of therapeutically administered exogenous FVIII in MZ of the spleen at level of metallophilic macrophages and MZ B cells was identified as an initial step in the induction of the neutralizing anti-FVIII immune response.<sup>12,13</sup> Growing evidence suggests that microvasculature endothelial cells are the natural site of production of FVIII.<sup>14,15</sup> Further work will indicate whether targeting mRNA delivery to the endothelium using improved nanoparticles<sup>16</sup> and/or introducing target sequences that have complimentary to the hematopoietic-specific microRNA are plausible strategies to improve the levels of FVIII production and reduce the immunogenicity of the endogenously produced FVIII.

## References

1. Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH, Hoyer LW. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 1999;81(2):240–244.
2. Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 2013;121(20):4046–4055.
3. Reipert BM, Ahmad RU, Turecek PL, Schwarz HP. Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 2000;84(5):826–832.
4. Ing M, Gupta N, Teyssandier M, et al. Immunogenicity of long-lasting recombinant factor VIII products. *Cell. Immunol.* 2016;301:40–48.
5. Ramaswamy S, Tonnu N, Tachikawa K, et al. Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017;114(10):E1941–E1950.
6. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature.* 2017;543(7644):248–251.
7. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732–738.
8. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004;303(5663):1526–1529.
9. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* 2006;314(5801):994–997.
10. Schlee M, Roth A, Hornung V, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity.* 2009;31(1):25–34.
11. Li B, Luo X, Deng B, et al. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* 2015;15(12):8099–8107.
12. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(11):1816–1823.
13. Zerra PE, Cox C, Baldwin WH, et al. Marginal zone B cells are critical to factor VIII inhibitor formation in mice with hemophilia A. *Blood.* 2017;
14. Shahani T, Lavend'homme R, Luttun A, et al. Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood.* 2010;115(23):4902–4909.
15. Pan J, Dinh TT, Rajaraman A, et al. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood.* 2016;128(1):104–109.
16. Dahlman JE, Barnes C, Khan O, et al. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nanotechnol.* 2014;9(8):648–655.

Supplemental figure



**Figure S1. Induction of an anti-FVIII immune response after repeated injections of coFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA.** FVIII-deficient mice were injected intravenously with 1 µg of coFVIII<sup>HSQ</sup>-encoding mRNA formulated in TransIT® (full circles), or with 5 IU recombinant BDD-FVIII (empty squares), once a week for 7 weeks. FVIII:Ag (panel A) and FVIII:C (panel B) were measured in plasma 24 hours after each injection. Anti-FVIII IgG (panel C) and inhibitory titers were measured in plasma 72 hours after each injection. Results are depicted as mean±SEM for 4-7 mice per group. The vertical dotted lines represent the days of FVIII/mRNA administration. The horizontal dotted line (panel D) represents the threshold for detection.

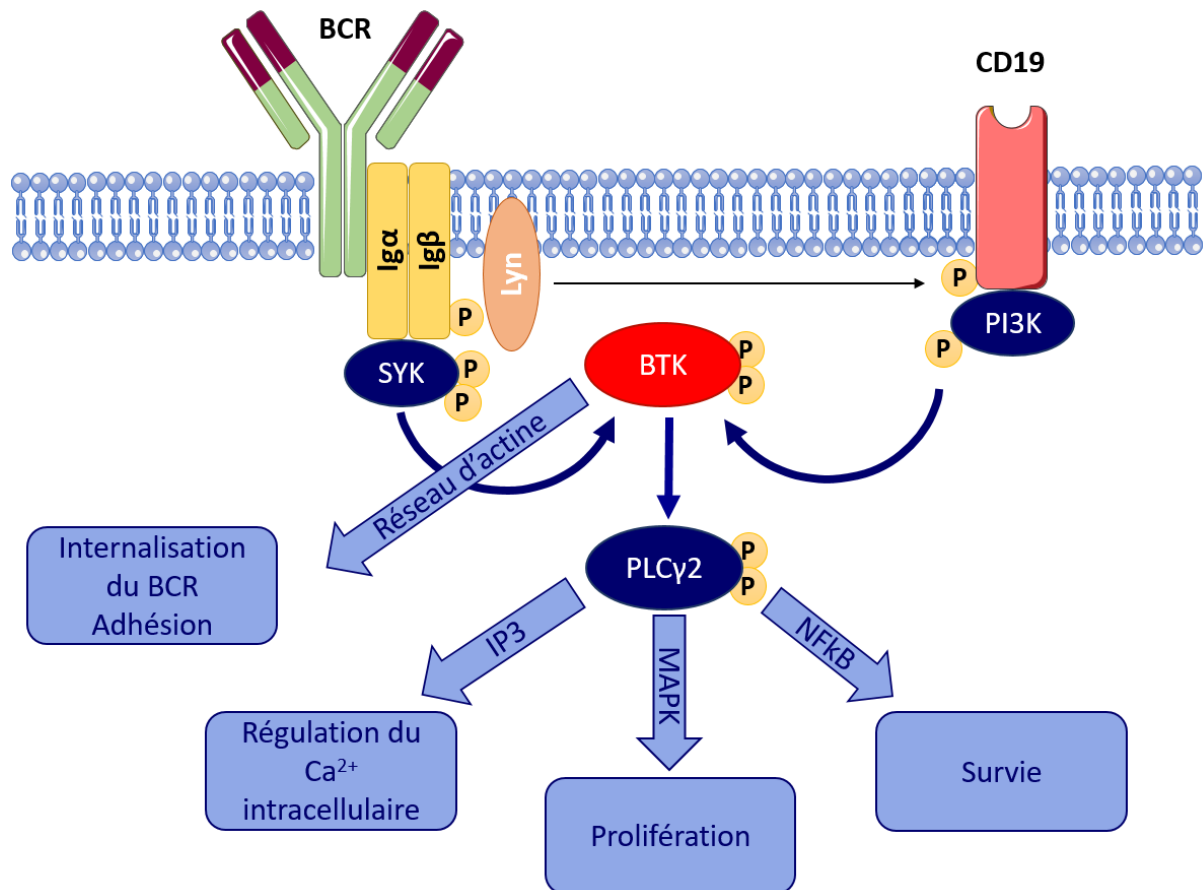
## II. Prévention de la réponse mémoire anti-FVIII par inhibition de la 'Bruton's Tyrosine Kinase' (Btk) chez la souris déficiente en FVIII

(Soumis à *Haematologica*, réf HAEMATOL/2018/200279)

L'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII est la complication la plus redoutée chez les patients hémophiles A. Pour les 25 à 30% des patients qui développent ces IgG inhibant le FVIII, cette réponse anti-FVIII constitue une réelle impasse thérapeutique. L'apparition d'une telle réponse oblige les patients à subir des protocoles d'induction de tolérance immunitaire (ITI). Ces protocoles consistent en l'injection régulière de fortes doses de FVIII pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. En plus d'être coûteux et très contraignants, les protocoles d'ITI ne sont couronnés de succès que dans 60 à 80% des cas<sup>67</sup>. De plus, comme nous l'avons vu en introduction (paragraphe « Mécanismes d'induction de tolérance »), les mécanismes qui régissent cette induction de tolérance sont toujours mal connus. Cependant, les acteurs impliqués sont identifiés et parmi eux, les LB anti-FVIII représentent une cible thérapeutique évidente. En effet, ils sont source de spécificité via la liaison de l'antigène à leur BCR et sont également les cellules qui produisent, après différenciation, les inhibiteurs. Ainsi, les LB anti-FVIII naïfs et mémoires ont déjà été ciblés dans de nombreuses études visant à induire une tolérance au FVIII<sup>299,320,361</sup>.

Le BCR est une immunoglobuline de surface complexée aux protéines transmembranaires Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  (ou CD79A et CD79B, respectivement) qui portent des motifs activateurs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), permettant la transmission du signal. Lorsqu'un antigène se lie au BCR, ces motifs ITAM sont phosphorylés par la kinase Lyn, ce qui entraîne le recrutement de la protéine Syk. En parallèle, Lyn phosphoryle également une tyrosine présente dans la partie cytoplasmique de CD19, le corécepteur du BCR. A nouveau, cela entraîne le recrutement et l'activation de kinases telles que PI3K, qui, par l'intermédiaire de PIP3, recrute la Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) sous la membrane. Syk et Lyn activent alors la Btk qui phosphoryle son substrat, la phospholipase C- $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2). Cette dernière génère des messagers secondaires (notamment l'inositol triphosphate et le diacylglycérol) qui déclenchent l'induction d'un

flux calcique, l'activation des facteurs de transcription NfκB, NFAT, l'activation de ERK et un remodelage du cytosquelette. L'activation de ces nombreuses voies de signalisation a pour conséquence la survie, l'activation, la prolifération et à terme la différenciation du LB<sup>362,363</sup>. La Btk est donc essentielle à l'activation des LB via leur BCR.



**Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation du BCR.** La fixation d'un antigène au BCR induit la phosphorylation, par Lyn, des motifs ITAM sur les molécules transmembranaires Igα et Igβ. Syk est alors recrutée au niveau des ITAM phosphorylés et activée par Lyn, par phosphorylation et trans-autophosphorylation. En parallèle, Lyn phosphoryle également une tyrosine présente dans la partie cytoplasmique de CD19, le corécepteur du BCR. Cette phosphorylation favorise la formation d'un complexe de signalisation au niveau de la membrane plasmique qui résulte dans la production de PI3K. Par l'intermédiaire de PIP3, il recrute la Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) sous la membrane. Syk et Lyn activent alors la Btk qui phosphoryle la phospholipase C-γ2 (PLCγ2) qui, via des messagers secondaires, déclenche l'induction d'un flux calcique, l'activation des facteurs de transcription NfκB, NFAT, l'activation de ERK et un remodelage du cytosquelette. Cela a pour conséquence la survie, l'activation, la prolifération et à terme la différenciation du LB.



La Btk représente donc une cible thérapeutique de choix puisque sa seule inhibition permet l'inhibition de l'ensemble des processus cellulaires déclenchés par le BCR. L'importance de la Btk est notamment illustrée par les patients atteints du syndrome XLA (X-Linked Agammaglobulinemia), qui présentent une mutation dans le gène codant la Btk. Cela se traduit par un défaut de maturation des LB (bloquage au stade pré-B), des LB circulants peu nombreux et avec un phénotype immature IgM<sup>high</sup>. Le répertoire est enrichi en BCR autoréactifs et les taux d'Ig circulantes sont faibles<sup>364-366</sup>. Le modèle murin de la XLA est la souris Xid (X-linked immunodeficiency), généré par l'insertion de mutations dans le gène codant Btk. Bien que ce modèle présente un phénotype moins sévère que celui retrouvé dans la XLA, ces souris sont protégées contre l'auto-immunité. Cela est probablement lié à la diminution du nombre de LB, ainsi que de leur activation. La Btk est donc également ciblée dans des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé ou la polyarthrite rhumatoïde<sup>332</sup>.

Les inhibiteurs de la Btk ont été développés dans le cadre des proliférations lymphoïdes B malignes et ainsi empêcher la prolifération tumorale. En effet, dans la leucémie lymphocytaire chronique (chronic lymphocytic leukemia – CLL), la Btk est sur-exprimée par les cellules B, menant à une activation constitutive du BCR et donc à la croissance tumorale<sup>367</sup>. Le premier inhibiteur de la Btk a été développé en 1999 et son effet protecteur contre des cellules B de leucémie, validé *in vivo*<sup>368,369</sup>. Depuis, de nombreux inhibiteurs ont été développés et parmi eux, l'Ibrutinib. Cet inhibiteur se lie de façon covalente à la cystéine en position 481, proche du site de liaison de l'ATP à la Btk. Il inhibe ainsi l'activité kinase de la Btk de manière irréversible. Cependant, l'ibrutinib inhibe également l'Interleukin-2-inducible T-cell Kinase (Itk), une enzyme essentielle à la survie des LT Th2. Ainsi, il permet un décalage de la balance vers les Th2 et promeut d'autant plus l'immunité antitumorale. On compte aujourd'hui 273 essais cliniques impliquant l'ibrutinib ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), recherche « ibrutinib » + « PCI-32765 » et « Imbruvica »), qui ont notamment permis de montrer qu'il était plus efficace que les traitements recommandés (chlorambucil et ofatumumab) dans la CLL. Il permet en effet une réponse chez 43% des patients atteints de CLL contre 4% lorsqu'ils sont traités avec l'ofatumumab, permettant une survie de 90% d'entre eux à 12 mois<sup>370</sup>. L'ibrutinib est désormais approuvé, sous le nom d'Imbruvica®, en monothérapie dans le traitement du

lymphome du manteau (Mantle Cell Lymphoma - MCL), de la CLL et de la macroglobulinémie de Waldenstrom<sup>363,371</sup>. De plus, *in vitro*, l'ibrutinib interfère avec l'ADCC médiée par le Rituximab<sup>372</sup>. Cela pourrait expliquer que les nombreux essais cliniques de traitements combinant Ibrutinib et anticorps anti-CD20 ne montrent pas une amélioration significative<sup>373</sup>. En effet, de nombreux essais cliniques étudient la possibilité de combiner l'inhibition de la Btk avec d'autres stratégies, notamment avec des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires (immune checkpoints). Ces molécules sont des régulateurs de la réponse immunitaire et leur inhibition est une stratégie utilisée pour amplifier une réponse immunitaire (notamment antitumorale). Ainsi, la combinaison de ces deux stratégies est étudiée et il a été montré *in vivo* que l'utilisation combinée de l'ibrutinib et d'un anti-PD-L1 permet non seulement d'inhiber la croissance tumorale de tumeurs insensibles à l'ibrutinib seul, mais renforce également l'effet de l'anti-PD-L1<sup>374</sup>.

L'objectif de ce projet était d'évaluer l'effet d'un inhibiteur de la Btk sur l'apparition de la réponse primaire anti-FVIII et sur le déclenchement d'une réponse mémoire. En collaboration avec Sandrine Delignat, nous avons validé l'inhibition spécifique de la voie du BCR *in vitro* par un inhibiteur de la Btk développé par Pfizer. Le (R)-5-amino-1-(1-cyanopiperidin-3-yl)-3-(4-[2,4-difluorophenoxy]phényl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (aussi appelé PF-06250112) est un inhibiteur qui, tout comme l'ibrutinib, forme une liaison covalente avec la cystéine 481 de la Btk. En revanche, contrairement à l'ibrutinib, l'inhibition par le PF-06250112 est réversible et ce dernier ne présente pas de réaction croisée avec l'Itk des LT<sup>375</sup>.

Nous avons évalué son effet sur la réponse primaire anti-FVIII *in vivo* en gavant des souris déficientes en FVIII, 5 jours consécutifs par semaine avec l'inhibiteur. Le FVIII a été administré par voie intraveineuse 2h après le premier gavage hebdomadaire, permettant ainsi une présence de l'inhibiteur pendant toute la durée de présence du FVIII (demi-vie du PF-06250112 : 7h; demi-vie du FVIII chez la souris : 8h). Après 4 semaines, les LB spléniques étaient diminuées chez les souris traitées avec l'inhibiteur. Cependant, cela ne corrélait pas avec une diminution des titres d'inhibiteurs du FVIII. Sachant qu'une étude a montré que l'inhibition de la Btk a un effet plus important sur les LB possédant un BCR de forte affinité pour l'antigène<sup>376</sup>, nous avons évalué l'effet du PF-06250112 sur les LB

mémoires. Des souris déficientes en FVIII ont été sensibilisées au FVIII et traitées avec l'inhibiteur de la Btk. Nous avons alors constaté une diminution significative des titres inhibiteurs chez ces souris. Ces résultats ont ensuite été confirmés lors d'expériences de transfert adoptif de LB mémoire de souris sensibilisées au FVIII, à des souris receveuses. Les souris receveuses étaient ensuite traitées, ou pas, pendant 2 semaines avec le PF-06250112. Les souris ayant reçu des LB mémoires spécifiques du FVIII et traitées avec l'inhibiteur de la Btk, en plus du FVIII, ne développaient pas d'anticorps anti-FVIII, contrairement aux souris receveuses simplement traitées avec du FVIII.

Ces résultats démontrent que l'inhibition de la Btk par le PF-06250112 n'empêche pas le développement d'une réponse primaire au FVIII. En revanche, ils confirment que l'inhibition de la voie du BCR dans des LB avec un BCR de forte affinité pour le FVIII permet d'éviter l'apparition d'une réponse mémoire au FVIII. Sachant qu'un des facteurs associés au succès de l'ITI est le pic d'inhibiteurs au cours des premières semaines de l'ITI, l'inhibition de la Btk lors de cette période pourrait permettre le contrôle de ce pic, augmentant ainsi considérablement les chances de réussite de l'ITI.

Néanmoins, chez presque 20% des patients, la prise d'ibrutinib cause des saignements majeurs<sup>377,378</sup>. Si la grande majorité (70%) des patients ayant eu ces saignements prenaient également des agents antiplaquettaires, il faudra vérifier l'inocuité du PF-06250112 sur l'hémostase primaire. De plus, l'utilisation de l'ibrutinib se trouve également limitée par l'apparition d'une résistance. En effet, chez des patients traités avec cet inhibiteur irréversible de la Btk, on constate l'apparition d'une mutation de la cystéine 481 en sérine, abrogeant la fixation de l'ibrutinib à la Btk<sup>379</sup>. Ainsi, 67% des patients ayant subi une rechute de LLC ont la mutation C841S<sup>380</sup>. L'utilisation d'un inhibiteur réversible devrait éviter cette limitation.

**Title.** Prevention of the anti-factor VIII memory B-cell response by inhibition of the Bruton's tyrosine kinase in experimental hemophilia A

**Short title.** BTK inhibition prevents anti-FVIII memory response

Sandrine Delignat<sup>1,2,3</sup>, Jules Russick<sup>1,2,3</sup>, Bagirath Gangadharan<sup>1,2,3</sup>, Julie Rayes<sup>1,2,3</sup>, Mathieu Ing<sup>1,2,3</sup>, Jan Voorberg<sup>4</sup>, Srinivas V Kaveri<sup>1,2,3</sup>, Sébastien Lacroix Desmazes<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France;

<sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers,

Paris, F-75006 France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 1138, Centre de Recherche des

Cordeliers, Paris, F-75006 France; ; <sup>4</sup>Department of Plasma Proteins, Sanquin Research and

Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam,

The Netherlands.

**Corresponding author:** Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France - Tel: 01 44 27 82 02 - Fax: 01 44 27 81 93. Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

**Word count for text:** 3526, **Word count for abstract:** 239, **Number of figures:** 5, **Number of tables:** 0, **Number of references:** 41

### **Abstract**

Hemophilia A is a rare hemorrhagic disorder due to the lack of functional pro-coagulant factor VIII (FVIII). FVIII replacement therapy in patients with severe hemophilia A results in the development of inhibitory anti-FVIII IgG in up to 30% of the cases. To date, immune tolerance induction (ITI) upon daily injection of large amounts of FVIII is the only strategy to eradicate FVIII inhibitors. It is however efficient in only 60-80% of the patients. Recently, the success of ITI was associated with lower recall humoral responses at the beginning of the treatment. Here, we investigated whether blocking B-cell receptor (BCR) signaling upon inhibition of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) prevents anti-FVIII immune responses in a mouse model of severe hemophilia A. Naïve and FVIII-sensitized FVIII-deficient mice were fed with the selective BTK inhibitor, (R)-5-amino-1-(1-cyanopiperidin-3-yl)-3-(4-[2,4-difluorophenoxy] phenyl)-1H pyrazole-4-carboxamide (PF-06250112), to inhibit BCR signaling prior to challenge with exogenous FVIII, and the consequences on the anti-FVIII immune response were studied. Inhibition of BTK during the primary anti-FVIII immune response in naïve mice did not prevent the development of inhibitory anti-FVIII IgG. In contrast, the anti-FVIII memory B-cell response was drastically reduced upon treatment of FVIII-challenged mice with BTK. BTK inhibited the differentiation of memory B cells *ex vivo* and *in vivo* following adoptively-transferred to naïve animals. Taken together, our data identify inhibition of BTK using PF-06250112 as a strategy to prevent the reactivation of FVIII-specific memory B cells upon re-challenge with therapeutic FVIII.

### **Introduction**

Hemophilia A is a rare X-linked hemorrhagic disorder that results from suboptimal levels of pro-coagulant factor VIII (FVIII). Treatment or prevention of bleeding is managed by replacement therapy using therapeutic FVIII, which restores coagulation. However, in up to 30% of severe hemophilia A patients administration of exogenous FVIII is complicated by the development of anti-FVIII antibodies that neutralize FVIII pro-coagulant activity and are referred to as 'FVIII inhibitors'.<sup>1,2</sup> To date, the most efficient strategy to eradicate inhibitors in inhibitor-positive patients with the severe form of the disease, consists in repeated injections of high-doses of FVIII and is referred to as 'Immune tolerance induction' (ITI). Proposed mechanisms of action of ITI include the induction of protective anti-idiotypic antibodies that neutralize FVIII inhibitors as observed in hemophilia A patients,<sup>3,4</sup> and the inhibition of FVIII-specific memory B cells as suggested in experiments in FVIII-deficient mice.<sup>5</sup> ITI is however prohibitively costly, requires extreme compliance from the patients and their families, and is successful in only 60-80% of the cases.<sup>6-8</sup> The direct depletion of B cells with the anti-CD20 antibody Rituximab (Mabthera®) is also used, however with limited success and unpredictable consequences in the long-term in populations of pediatric patients.<sup>9</sup> The development of FVIII inhibitors results from the engagement of a classical T-cell-dependent immune response<sup>10</sup> as evidenced by the presence of class-switched, high affinity anti-FVIII antibodies. B cells play key roles in primary T-cell dependent immune responses, by forming and sustaining germinal centers (GCs), by differentiating into antibody-secreting plasma cells (ASCs) and possibly, as recently suggested, as antigen-presenting marginal zone (MZ) B cells involved in the initially stages of activation of immune effectors.<sup>11</sup> During recall responses, memory B cells can be reactivated upon antigen encounter and differentiate into plasma cells, replenish the memory B cell pool or participate as key professional antigen-presenting cells (APCs) owing to a higher prevalence of the cells and to the expression of a

higher affinity antigen-specific B cell receptor (BCR).<sup>12,13</sup> Antigen-specific B cells are thus potential targets to prevent primary or recall antigen-specific immune responses.

Engagement of the surface exposed BCR by the cognate antigen triggers the formation of an intracellular signaling complex which enhances downstream signaling through the phosphorylation and ubiquitination of proteins. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a key proximal and rate-limiting component of the signaling cascade critical for B-cell activation, proliferation and survival.<sup>14</sup> This cytosolic Tec kinase is activated only when BCR signaling promotes its recruitment at the inner cell membrane. Activated BTK in turn phosphorylates the phospholipase C $\gamma$ 2, which leads to the downstream production of inositol triphosphate and diacylglycerol, resulting in calcium flux and finally to the activation of the NF- $\kappa$ B and NFAT-dependent pathways.<sup>16</sup> BTK is a strategic therapeutic target in B-cell malignancies requiring BTK signaling for cell survival, in autoimmune diseases associated with the presence of pathogenic autoantibodies such as rheumatoid arthritis<sup>15</sup> or lupus.<sup>16</sup> Several small-molecule inhibitors of BTK have been developed.<sup>17</sup> (R)-5-amino-1-(1-cyanopiperidin-3-yl)-3-(4-[2,4-difluorophenoxy] phenyl)-1H pyrazole-4-carboxamide, or PF-06250112, is a selective potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitor of BTK. PF-06250112 forms a covalent but reversible adduct with BTK upon binding to the Cys481 residue that is proximal to the ATP-binding pocket.<sup>18</sup> Using the mouse model of severe hemophilia A, we evaluated the therapeutic potential of BTK inhibition by PF-06250112 on the development of a primary anti-FVIII immune response and on the FVIII-specific memory B-cell recall response.

### **Material and methods**

#### **PF-06250112 formulation**

For *in vitro* studies, PF-06250112 (Pfizer, New York, NY, USA) was solubilized at 1 mg/ml in dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). For *per os* administration, PF-

06250112 was prepared in 0.5% methylcellulose, 0.5% hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate H grade and 20 mM Tris at pH 7.4.

### **Flow cytometry**

BTK inhibition with PF-06250112 was evaluated on splenocytes labelled with anti-CD86-FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), and anti-B220-PE (BioLegend, San Diego, CA, USA). Phenotypic analyses were performed using anti-CD4-Alexa 700, anti-CD19-Pacific Blue (Biolegend), anti-CD45-APC (eBiosciences, San Diego, CA, USA); anti-CD3e-FITC, anti-CD11b-PE (BD Pharmingen), anti-CD21-APC Cy7, anti-CD23-PE Cy7 and anti-GL7 Alexa 488 (Biolegend). FACS analysis was done on live cells using BD LSRII and FACSDiva software.

### **Treatment of FVIII-deficient mice**

Seven to 11 week-old exon 16 FVIII-deficient mice on the C57Bl/6 background (gift from Prof H.H. Kazazian, Department of Genetics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia) were handled in agreement with ethical authority guidelines (authorization #2058.04). PF-06250112 and analogs have half-lives of about 7 hours.<sup>18,19</sup> Mice were fed for 5 consecutive days every week with PF-06250112 or vehicle in order to cover about 10 FVIII half-lives.<sup>20</sup> For preventive treatment, mice were injected intravenously with 0.5 µg of human recombinant B domain-deleted FVIII (BDD-FVIII, Refacto®, Pfizer) once a week 2 hours after the second feeding with PF-06250112, for 4 weeks. Mice were bled 5 days after the fourth FVIII injection. To obtain FVIII-sensitized mice, FVIII-deficient mice were injected intravenously with 1 µg of BDD-FVIII or PBS once a week for 4 to 5 weeks.

### **Evaluation of anti-FVIII immune responses**

Anti-FVIII IgG in mouse serum were measured by ELISA and FVIII inhibitory titers were measured with a chromogenic assay (Siemens, Marburg, Germany).<sup>21</sup> Proliferation of splenocytes was assessed in 96-well plates ( $0.25 \cdot 10^6$  cells/well) with concanavalin A (Sigma)



or BDD-FVIII for 72 hrs.<sup>22</sup> Cell proliferation was measured by incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine (0.5 µCi/well) for an additional 18 hours, using a beta counter (Microbeta 1450, Perkin Elmer).

### **Stimulation of adoptively transferred memory B cells**

Spleens from FVIII-sensitized mice were collected 7 days after the fourth injection with FVIII. After lysis of erythrocytes, plasma cells were depleted using a goat anti-mouse CD138 polyclonal antibody (BD Pharmingen), conjugated to anti-goat IgG coated Dynabeads (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).<sup>23</sup> Naïve FVIII-deficient mice were then injected intravenously with 10<sup>7</sup> CD138-depleted splenocytes. Feeding of mice with PF-06250112 was initiated 24 hours after adoptive transfer, 1 µg of BDD-FVIII or PBS was injected intravenously 2 hours after the first feeding. Mice were bled 14 days after FVIII injection.

### ***Ex vivo* memory B cell differentiation assay**

Pooled splenocytes from 5 FVIII-sensitized mice having developed anti-FVIII IgG were cultured at 1.5.10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI-1640, with 10% fetal calf serum (Thermo Fisher), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 50 µM 2-mercaptoethanol without CD138 depletion for 6 days. At day 0, PF-06250112 or Vehicle was added at different concentrations 2 hours before stimulation of cells with FVIII (Advate®, Shire, Dublin, Ireland). For restimulation of memory B cells 1µg/ml of FVIII was used. After 6 days, the formation of FVIII-specific ASCs was assessed by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay with FVIII-coated plates (0.5µg Advate/well). After 2 hours of blocking with 10% FCS in RPMI medium, cells were incubated on the membrane and cultured overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After washing with PBS, 0.1% Tween 20, antibodies were detected using a goat anti-mouse IgG Alkaline-Phosphatase conjugated antibody (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA), and ASCs were revealed with Sigmafast 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) tablets (Sigma). Plates were scanned on an ImmunoSpot

Analyzer (CTL, Shaker Heights, OH, USA). Spots were automatically counted by ImmunoSpot Software using the SmartCount™ and Autogate™ functions.

### Results

#### PF-06250112 inhibits BCR signalization

BCR engagement initiates an intracellular signaling cascade that induces the BTK-dependent activation of B cells.<sup>14</sup> PF-06250112 has recently been described to inhibit BCR-mediated B-cell signaling, activation and proliferation.<sup>18</sup> We confirmed the effect of PF-06250112 on splenic B cells by monitoring the upregulation of CD86 in response to B-cell triggering with anti-IgM or anti-IgD for *in vitro* and *in vivo* assays, respectively. Pre-treatment of purified splenic B cells by PF-06250112 prevented in a dose-dependent manner the induction of CD86 expression on B cells upon stimulation with anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> fragments (Figure 1A). It however marginally impacted CD86 expression upon stimulation of the cells with an anti-CD40 antibody. The calculated IC<sub>50</sub> was 1.1±0.6 nM (Figure 1A, inset), which is in agreement with previous observations.<sup>18</sup> The *in vivo* validation of PF-06250112 was performed using an anti-IgD antisera instead of the anti-IgM antibody in order to avoid quenching of the triggering antibody by endogenous circulating IgM. The treatment of FVIII-deficient mice with PF-06250112 two hours prior to the injection of the anti-IgD antisera prevented anti-IgD-mediated CD86 induction, as measured *ex vivo* on splenic B cells (Figure 1B), and only marginally affected anti-CD40-mediated CD86 induction. The dose of 15 mg/kg of PF-06250112 was sufficient to prevent induction of CD86 expression in the mice and was used for further experiments.

#### BTK inhibition does not prevent primary anti-FVIII immune responses

We then investigated the potential of PF-06250112 to prevent the development of a naïve anti-FVIII immune response in FVIII-deficient mice. Mice were fed with PF-06250112 or

Vehicle, for 5 consecutive days per week during 4 weeks, and injected intravenously with FVIII on the second day of feeding (Figure 2A). The effect of four weeks of treatment with PF-06250112 was first evaluated on the splenic B and T-cell compartments. Analysis by flow cytometry revealed that chronic inhibition of BTK with PF-06250112 results in an increase in CD11b-positive cells ( $P=0.040$ , Figure 2B), which include monocytes, macrophages and natural killer cells, and in a significant decrease in CD4+ T cells ( $P=0.031$ ) and in different B-cell subsets, including follicular (Fo) and marginal zone (MZ) B cells ( $P=0.038$ , Figure 2C). Although statistically significant, changes in percent of the cell populations were biologically marginal. The anti-FVIII IgG titers measured after the fourth injection of FVIII in PF-06250112-treated mice ( $565\pm 170$  AU, mean $\pm$ SEM, Figure 2D) were not statistically different from that in Vehicle-treated mice ( $1133\pm 376$  AU,  $P=0.488$ ). Similarly, inhibitory titers did not statistically differ between PF-06250112-treated mice ( $123\pm 88$ , Figure 2E) and control mice ( $457\pm 219$ ,  $P=0.572$ ). The capacity of splenic T cells to proliferate in the presence of FVIII or concanavalin A was similar in the two groups of mice (Figures 2F and 2G). Thus, inhibition of BTK at the time of FVIII injection does not prevent the onset of a naïve anti-FVIII immune response.

#### **BTK inhibition alters memory FVIII-specific B cells response**

We investigated the effect of BTK inhibition in the context of a memory anti-FVIII B-cell response, where the FVIII-specific BCRs in principal have a higher affinity for FVIII than that of BCRs of naïve B cells. FVIII-deficient mice were injected with FVIII once a week for four weeks, and then left untouched for 90 days to allow the spontaneous elimination of FVIII-specific short-lived plasmocytes.<sup>24</sup> FVIII-sensitized mice were then fed with Vehicle or PF-06250112, five consecutive days per week for 2 weeks. Mice received one FVIII injection 2 hours after each second weekly feeding. Levels of anti-FVIII IgG were measured before, 7 and 14 days after initiation of feeding (Figure 3A). Anti-FVIII IgG titers measured 90 days

after repeated FVIII challenge were heterogeneous among mice (Figure 3B). The levels of anti-FVIII IgG depicted in Figure 3C were therefore normalized with respect to the initial levels of anti-FVIII IgG measured for each individual mouse. Feeding mice with PF-06250112 drastically dampened the increase of anti-FVIII IgG response, as compared to control mice ( $P < 0.05$ , Figure 3C).

We then exploited an alternative model in order to study the effect of PF-06250112 in the absence of a potential bias provided by the presence of plasma cells and circulating anti-FVIII IgG. Splenocytes from FVIII-treated mice or naïve mice were depleted of CD138-positive plasmacytes and adoptively transferred to naïve FVIII-deficient mice as previously described.<sup>23</sup> Feeding of the recipient mice with PF-06250112 or Vehicle was initiated on the next day, and one injection of FVIII was performed 2 hours after the first feeding (Figure 4A). The treatment of mice with PF-06250112 prevented the production of anti-FVIII IgG as compared to control mice ( $0.9 \pm 0.3$  versus  $124.0 \pm 115.7$ ,  $P = 0.011$ , Figure 4B). Anti-FVIII IgG titers in PF-06250112-treated mice injected with FVIII were similar to that of control mice adoptively transferred with splenocytes from FVIII-sensitized mice injected with PBS and to that of control mice adoptively transferred with splenocytes from naïve and FVIII-injected mice. We further performed re-stimulation of FVIII-specific memory B cells *ex vivo*. Splenocytes from FVIII-sensitized FVIII-deficient mice having developed a humoral response to FVIII were isolated and pre-treated with PF-06250112 or Vehicle before stimulation with FVIII. After 6 days of culture, FVIII-specific ASCs were measured by ELISPOT. A statistically significant dose-dependent reduction of ASCs formation was observed when splenocytes were pre-incubated with PF-06250112 as compared to splenocytes pre-incubated with Vehicle, prior stimulation with FVIII ( $P \leq 0.003$ , Figure 5). Thus, inhibition of BTK prevents the activation of FVIII-specific memory B cell response.

### Discussion

The occurrence of FVIII inhibitors following FVIII replacement therapy remains a major clinical and societal challenge in hemophilia A. B cells are a key effector of the anti-FVIII immune response. Depending on their subtype and localization and depending on the stage of the immune response, B cells play different roles as i) APCs either in the initiation phase of immune response (i.e., MZ B cells involved in FVIII capture and trafficking in the spleen),<sup>12</sup> or in recall responses (higher number of FVIII-specific memory B cells with high affinity FVIII-specific BCRs), and ii) precursors of ASCs (that produce FVIII inhibitors) localized in the spleen or in the bone marrow. Therefore, B cells represent an ideal therapeutic target either to prevent the initiation of anti-FVIII immune responses or to eradicate ongoing responses in inhibitor-positive patients. Incidentally, the only strategies known to eradicate FVIII inhibitors in patients target B cells. ITI was shown to favor the development of anti-idiotypic antibodies that neutralize FVIII inhibitors<sup>3,4</sup> and, at least in mice, to eliminate FVIII-specific memory B cells.<sup>5</sup> Likewise, the use of the therapeutic anti-CD20 antibody Mabthera (Rituximab) specifically targets CD20-expressing naïve and memory B cells, thus preventing the replenishment of the pool of plasma cells upon re-challenge with therapeutic FVIII. Both strategies fail to target long-lived plasma cells that reside in niches in the bone marrow and lack expression of CD20 and of the BCR.<sup>25</sup> Attempts to target plasma cells in FVIII-deficient mice using either inhibitors of the proteasome<sup>26</sup> or cocktails of immunosuppressive agents<sup>27</sup> have met with limited success or lack of antigen specificity. Here, we investigated a new approach to prevent the activation of FVIII-specific B cells by inhibiting BTK, a kinase involved in upstream BCR signalization, at the time of administration of therapeutic FVIII. We first validated that, upon BCR triggering, PF-06250112 blocks BCR signaling *in vitro* and *in vivo* by measuring the induction of CD86 expression, a co-stimulation molecule involved in anti-FVIII immune response.<sup>28</sup> PF-06250112 inhibited BCR signalization *in vitro* with an IC<sub>50</sub>

of about 1 nM, a value close to that reported previously.<sup>18</sup> PF-06250112 used at 15 mg/kg also inhibited the induction of CD86 *in vivo* following stimulation of splenic B cells with an anti-IgD serum. A marginal effect of PF-06250112 was observed on B cells stimulated by CD40 ligation, a BCR-independent pathway. This moderate alteration of CD40 signaling had also been reported in the case of PCI-32765, another BTK inhibitor; a possible interference of BTK inhibitors on CD40-induced the NFkB-signaling was evoked.<sup>29</sup>

As previously reported in an experimental model of SLE<sup>18</sup> or using immunization of mice with the T-dependent model antigen SRBC,<sup>19</sup> the regular *per os* administration of PF-06250112 of FVIII-deficient mice led to a statistically significant decrease in the percentages of MZ and Fo B cells. In contrast to the latter reports however, there was no change in percentages of splenic GC B cells, possibly owing to the use of a different antigen or of a different disease model. In our hands, the treatment of FVIII-deficient mice with PF-06250112 failed to prevent the onset of a naïve anti-FVIII immune response. Exogenously administered FVIII was previously shown to closely associate with MZ macrophages and MZ B cells.<sup>11,30,31</sup> The depletion of MZ macrophages or MZ B cells was independently shown to delay the onset of anti-FVIII immune response.<sup>11,30</sup> However, it is not clear whether reduced immune responses to FVIII following depletion of MZ macrophages or B cells result from the direct implication of these cells in FVIII internalization and presentation to T cells, or trafficking to the GC, or from a mere disruption of the spleen architecture.<sup>32</sup> The lack of effect of chronic BTK inhibition on the development of naïve anti-FVIII humoral responses, despite an alteration of peripheral B-cell populations including MZ B cells, suggests that MZ macrophages are the principal APCs at play in the onset of naïve anti-FVIII immune responses, at least in mice. PF-06250112 feeding was also associated with a modest decrease in percentages of CD4+ T cells. PF-06250112 has been shown to be 10,000-fold more specific for BTK than for interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK)<sup>18</sup>. In addition, there is

no modulation of splenic T-cell populations in BTK-deficient mice.<sup>14</sup> Hence, the decrease in the percentage of CD4+ T cells does probably not reflect a direct effect of PF-06250112 on T cells in FVIII-sensitized mice, but rather a modulation of T-cell homeostasis consecutive to a decrease in splenic Fo and MZ B cells.

The inhibition of BTK using PF-06250112 was able to prevent the memory B-cell response towards therapeutic FVIII. We first demonstrated that the inhibition of BTK in primed mice drastically limits the increase in anti-FVIII IgG after a single re-challenge with FVIII. Plasma cells do not express BCR at their membrane and are therefore insensitive to BTK inhibition.<sup>19,33</sup> The continuous endogenous production of anti-FVIII IgG by resident plasma cells may have introduced a bias in our experimental setup. Indeed, the formation of immune complexes between circulating anti-FVIII IgG and the administered FVIII neutralizes FVIII and alters its immunogenicity.<sup>34</sup> In addition, immune complexes between FVIII and anti-FVIII IgG facilitate FVIII internalization by dendritic cells<sup>35</sup> and could skew the target APC population from memory B cells to dendritic cells or macrophages. In support of our initial observation however, the inhibition of BTK also prevented the *in vivo* re-activation of FVIII-specific memory B cells following adoptive transfer to naïve mice and administration of FVIII, as well as the *ex vivo* differentiation of memory B cells into ASCs.

Our finding that BTK inhibition was efficient in blocking anti-FVIII recall but not primary immune responses is reminiscent of recent observations. The chronic inhibition of BTK with an analog of PF-06250112 was shown to prevent immune responses to T-independent antigen or to T-dependent antigens only provided that BCR had a strong affinity for the antigen, and that antigen ligation induced a strong signaling of the BCR.<sup>14,19</sup> Memory B cells generally express BCRs of high affinity for their cognate antigen owing to affinity maturation in the GCs. In the case of the anti-FVIII B cell response, the rare human monoclonal anti-FVIII IgG studied to date were obtained following immortalization of memory B cells from inhibitor-

positive patients. The affinity of the anti-C2 domain IgG4k BO2C11 for FVIII<sup>36</sup> is  $10^{-11}$  M<sup>-1</sup> and that of the anti-C1 domain IgG4k LE2E9 is greater than the affinity of von Willebrand factor for FVIII (i.e.,  $K_D < 0.1$  nM).<sup>37</sup> Likewise, the affinity of polyclonal anti-FVIII IgG from inhibitor-positive patients was described to be in the low nanomolar range.<sup>38</sup> Indirectly, the efficacy of PF-06250112 to block the recall anti-FVIII immune response confirms that FVIII-specific memory B cells express high affinity BCR. Whether targeting PF-06250112 to FVIII-specific B cells using CD22L/FVIII-coated nanoparticles<sup>39</sup> may improve the specificity and efficacy of our approach remains to be established.

A strong predictor of ITI failure is the intensity of the inhibitory titer peak that is reached within the two weeks that follow ITI initiation.<sup>41</sup> Yet, the molecular and cellular mechanisms that underlie the reduced efficiency of ITI when the inhibitor peak is high after initiation of ITI are unknown. In particular, it is not understood whether a high level of circulating FVIII inhibitor reflects the quantitative or qualitative properties of the circulating anti-FVIII IgG, the affinity for FVIII of the BCR of memory B cells or the number of FVIII-specific memory B cells. We propose here that the inhibition of BTK-dependent BCR signaling as an adjunct therapy in patients starting ITI could increase the chances for ITI success by preventing the reactivation of FVIII-specific memory B cells.

### **Acknowledgements**

This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by a grant from Pfizer (Aspire Haemophilia research award 2014 WI185623). PF-06250112 was a gift from Pfizer according a 'Compound Transfer Program'-Grant. The monoclonal mouse FVIII heavy chain-specific IgG mAb6 was a kind gift from Prof Jean-Marie Saint-Remy (KUL, Leuven, Belgium). JR and MI were recipients of



fellowships from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. We would like to acknowledge Carole Lasne for technical assistance and the Centre d'Explorations Fonctionnelles (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for technical support.

### **Authors' contributions**

Designed research: SD, BG, JV, SLD

Performed research: SD, JRu, BG, JRa, MI

Analyzed data: SD, JRu, SVK, SLD

Wrote the paper: SD, SLD

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

The work was financially supported by Pfizer. The PF-06250112 compound was provided by Pfizer. The work was however conducted independently from Pfizer.

**References**

1. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Kornhuber B. Factor VIII inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992;340(8813):253.
2. Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost* 2004;2(7):1082–1095.
3. Gilles JG. Role of anti-idiotypic antibodies in immune tolerance induction. *Haemophilia* 2010;16(102):80–83.
4. Sakurai Y, Shima M, Tanaka I, Fukuda K, Yoshida K, Yoshioka A. Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. *Haematologica* 2004;89(6):696–703.
5. Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, et al. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* 2005;106(10):3415–3422.
6. Holstein K, Batorova A, Carvalho M, et al. Current view and outcome of ITI therapy - A change over time? *Thromb Res* 2016;14838–44.
7. Oldenburg J, Austin SK, Kessler CM. ITI choice for the optimal management of inhibitor patients - from a clinical and pharmacoeconomic perspective. *Haemophilia* 2014;20 Suppl 617–26.
8. Coppola A, Di Minno MND, Santagostino E. Optimizing management of immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A and inhibitors: towards evidence-based approaches. *Br J Haematol* 2010;150(5):515–528.
9. Leissinger C, Josephson CD, Granger S, et al. Rituximab for treatment of inhibitors in haemophilia A. A Phase II study. *Thromb Haemost* 2014;112(3):445–458.
10. Lacroix-Desmazes S, Navarrete A-M, André S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 2008;112(2):240–249.
11. Zerra PE, Cox C, Baldwin WH, et al. Marginal zone B cells are critical to factor VIII inhibitor formation in mice with hemophilia A. *Blood* [Epub ahead of print].
12. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381(6585):751–758.
13. Kurosaki T, Aiba Y, Kometani K, Moriyama S, Takahashi Y. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol Rev* 2010;237(1):104–116.
14. Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, et al. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 1995;3(3):283–299.
15. Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, et al. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nat Chem Biol* 2011;7(1):41–50.

16. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(29):13075–13080.
17. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* 2014;14(4):219–232.
18. Rankin AL, Seth N, Keegan S, et al. Selective inhibition of BTK prevents murine lupus and antibody-mediated glomerulonephritis. *J Immunol* 2013;191(9):4540–4550.
19. Benson MJ, Rodriguez V, von Schack D, et al. Modeling the clinical phenotype of BTK inhibition in the mature murine immune system. *J Immunol* 2014;193(1):185–197.
20. Dumont JA, Liu T, Low SC, et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood* 2012;119(13):3024–3030.
21. Delignat S, Dasgupta S, André S, et al. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica* 2007;92(10):1423–1426.
22. Dimitrov JD, Dasgupta S, Navarrete A-M, et al. Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 2010;115(13):2682–2685.
23. Hausl C, Ahmad RU, Schwarz HP, et al. Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood* 2004;104(1):115–122.
24. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15(3):160–171.
25. Mahévas M, Michel M, Weill J-C, Reynaud C-A. Long-Lived Plasma Cells in Autoimmunity: Lessons from B-Cell Depleting Therapy. *Front Immunol*;4.
26. Meslier Y, André S, Dimitrov JD, et al. Bortezomib delays the onset of factor VIII inhibitors in experimental hemophilia A, but fails to eliminate established anti-factor VIII IgG-producing cells. *J Thromb Haemost* 2011;9(4):719–728.
27. Liu CL, Lyle MJ, Shin SC, Miao CH. Strategies to target long-lived plasma cells for treating hemophilia A inhibitors. *Cell Immunol* 2016;30165–73.
28. Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood* 2000;95(4):1324–1329.
29. Herman SEM, Gordon AL, Hertlein E, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011;117(23):6287–6296.
30. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009;7(11):1816–1823.

31. Lai JD, Cartier D, Hartholt RB, et al. Early cellular interactions and immune transcriptome profiles in human factor VIII-exposed hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* [Epub ahead of print].
32. Kraal G, Mebius R. New Insights into the Cell Biology of the Marginal Zone of the Spleen. In: *International Review of Cytology*. Academic Press; p175–215.
33. Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol* 1994;152(2):557–565.
34. Meslier Y, André S, Teyssandier M, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Maternally transferred anti-factor VIII IgG reduce the anti-factor VIII humoral immune response in factor VIII-deficient mice. *Immunology* 2010;131(4):549–555.
35. Hartholt RB, Wroblewska A, Herczenik E, et al. Enhanced uptake of blood coagulation factor VIII containing immune complexes by antigen presenting cells. *J Thromb Haemost* 2017;15(2):329–340.
36. Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, et al. Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* 1998;92(2):496–506.
37. Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, et al. A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* 2000;95(1):156–163.
38. Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N, et al. Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood* 2000;95(11):3435–3441.
39. Macauley MS, Pfrengle F, Rademacher C, et al. Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. *J Clin Invest* 2013;123(7):3074–3083.
40. Unuvar A, Warriar I, Lusher JM. Immune tolerance induction in the treatment of paediatric haemophilia A patients with factor VIII inhibitors. *Haemophilia* 2000;6(3):150–157.
41. Hay CRM, DiMichele DM, International Immune Tolerance Study. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 2012;119(6):1335–1344.

**Legends to figures**

**Figure 1.** Inhibition of splenic B-cell activation by PF-06250112. Panel A. Splenic B cells from C57Bl/6 mice, purified by negative selection using the Pan B cell Isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) were plated ( $2 \cdot 10^6$  cells/ml) in RPMI, 10% FCS and treated with PF-06250112 or Vehicle (DMSO, 0 nM) for 2 hours. F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgM (10 µg/ml, Jackson Immunoresearch) or a monoclonal hamster anti-mouse CD40 antibody (5 µg/ml, clone HM40-3, BD Pharmingen) were added. After 24 hours, the expression of CD86 by live B220-positive cells was analyzed by flow cytometry. Results are representative of two independent experiments performed in triplicates (mean±SD). Treatment of B cells *in vitro* with PF-06250112 suppressed induction of CD86 expression with an IC<sub>50</sub> of  $1.1 \pm 0.6$  nM (Inset). Panel B. C57Bl/6 mice were fed with PF-06250112 or Vehicle (0 nM). After 2 hours, goat anti-IgD antisera (400 µl, eBiosciences), or rat anti-mouse CD40 IgG (100 µg, clone 1C10, Biolegend), were injected intraperitoneally. Eighteen hours later, mice were sacrificed and the expression of CD86 by live splenic B220-positive B cells was analyzed by flow cytometry. Representative of two independent experiments performed with 3 mice per group (mean±SD).

**Figure 2.** Treatment with PF-06250112 does not prevent the onset of a primary anti-FVIII immune response. Panel A. Experimental scheme for the preventive treatment of FVIII-deficient mice. Mice were fed for 5 days a week, during 4 weeks with PF-06250112 (15 mg/kg) or Vehicle, and injected with FVIII (0.5 µg BDD-FVIII) once a week, 2 hours after the second feeding of the week. Serum of mice was collected 5 days after the 4<sup>th</sup> injection with FVIII (day 27) and mice were sacrificed. Spleens were recovered to perform flow cytometry analysis and proliferation assays. Panels B and C. At sacrifice, the isolated splenocytes were labeled with anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD3 and anti-CD4

antibodies (% of live CD45-positive cells, Panel B). Follicular B cells (Fo) were identified as CD19<sup>+</sup>CD23<sup>high</sup>CD21<sup>low</sup>, marginal zone B cells (MZ) as CD19<sup>+</sup>CD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup>, germinal center B cells (GC) as CD19<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup> (% of live cells, Panel C). Panels D, E. After 4 weeks of treatment with PF-06250112 or Vehicle and FVIII, the anti-FVIII IgG titers (panel D) and inhibitory titers (panel E) were measured in the serum of the mice by ELISA with the mouse monoclonal anti-FVIII IgG mAb6 as a standard (expressed in arbitrary units, AU), and chromogenic assay, respectively. Panels F and G. Splenocytes ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 72 hours with FVIII (panel F) or with concanavalin A (ConA, panel G). The incorporation of tritiated thymidine is depicted as count per minute (CPM) after an additional 18 hours of incubation (9 mice per group, mean $\pm$ SEM). Data are representative of 2 independent experiments with 9 mice per group. Statistical differences were assessed with the non-parametric two-tailed Mann-Whitney test (ns: not significant).

**Figure 3. Treatment with PF-06250112 controls the recall response to FVIII.** Panel A. FVIII-deficient mice were injected with FVIII (0.5  $\mu$ g BDD-FVIII) once a week for 4 weeks. After 90 days, FVIII-deficient mice were fed for 5 days a week, during 2 weeks with PF-06250112 (15 mg/kg) or Vehicle, and injected with FVIII (1  $\mu$ g BDD-FVIII) only once, 2 hours after the second day feeding. Serum of mice was collected before the challenge with FVIII, and 7 and 14 days later. Panel B. Levels of anti-FVIII IgG were assessed by ELISA using the mouse monoclonal anti-FVIII antibody mAb6 as a standard. Mice were then randomly attributed to either the PF-06250112- or the Vehicle-fed groups. Panel C. Levels of anti-FVIII IgG were measured 7 and 14 days after the last injection of FVIII. IgG levels were normalized with respect to the initial levels of anti-FVIII IgG of each respective mouse measured at Bleed 0. Graphs depict means $\pm$ SEM of three independent experiments. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA, using the Bonferroni post-test.

**Figure 4. Treatment with PF-06250112 inhibits the anti-FVIII memory B-cell response.**

Panel A. FVIII-deficient mice were injected with PBS or FVIII (1  $\mu$ g BDD-FVIII) once a week for 4 weeks. Seven days after the last injection, mice were sacrificed and spleens were collected and pooled. CD138-depleted splenocytes ( $10 \cdot 10^6$  cells/mouse) from FVIII-treated or naïve (PBS-treated) FVIII-deficient mice were adoptively transferred to naïve FVIII-deficient mice. From the next day onwards, host FVIII-deficient mice were fed during 2 weeks with 15 mg/kg of PF-061250112 or Vehicle, daily for 5 days. Mice were injected with FVIII or PBS once 2 hours after the first feeding. Panel B. Levels of anti-FVIII IgG were measured by ELISA 14 days after FVIII challenge. Means $\pm$ SEM are depicted on the graph. Statistical differences were assessed with the non-parametric two-tailed Mann-Whitney test.

**Figure 5. PF-06250112 inhibits the *ex vivo* differentiation of FVIII-specific memory B cells into ASCs.**

Splenocytes from FVIII-sensitized FVIII-deficient mice having developed a humoral response to FVIII were isolated 14 days after the last injection of FVIII. Pooled splenocytes were cultured for 6 days in the presence of 1  $\mu$ g/ml FVIII. Splenocytes were incubated with Vehicle or PF-06250112 two hours before adding FVIII. At day 6, newly differentiated anti-FVIII ASCs were detected by ELISPOT. The graph depicts means $\pm$ SEM. Statistical differences were assessed with the non-parametric two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 1

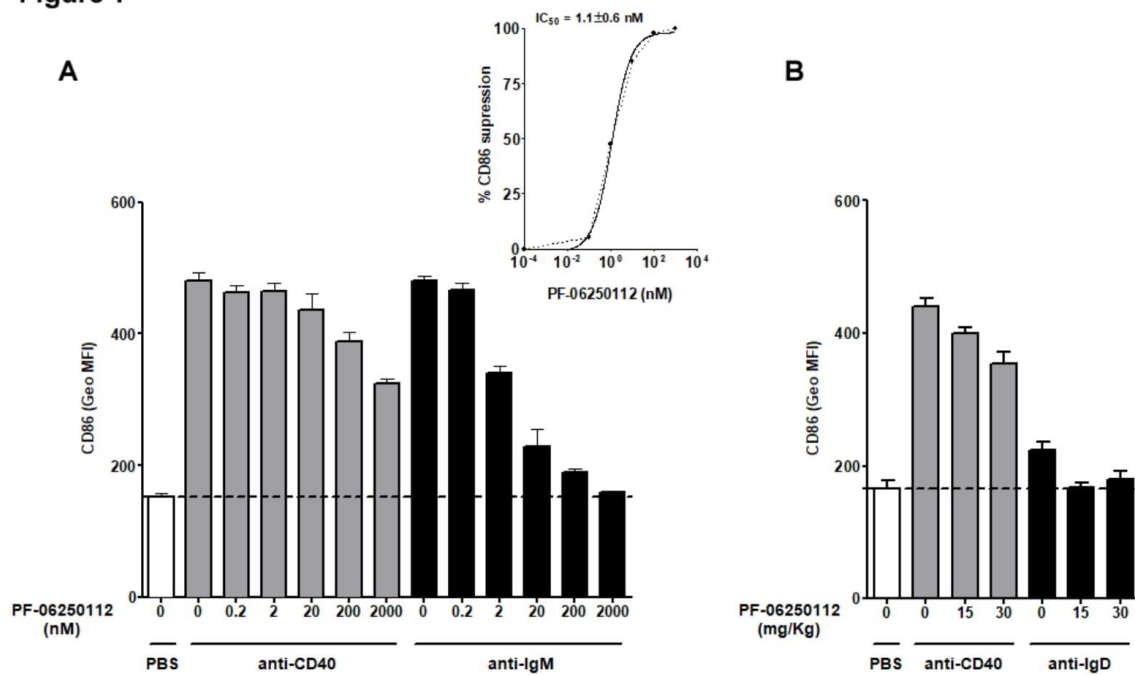




Figure 2

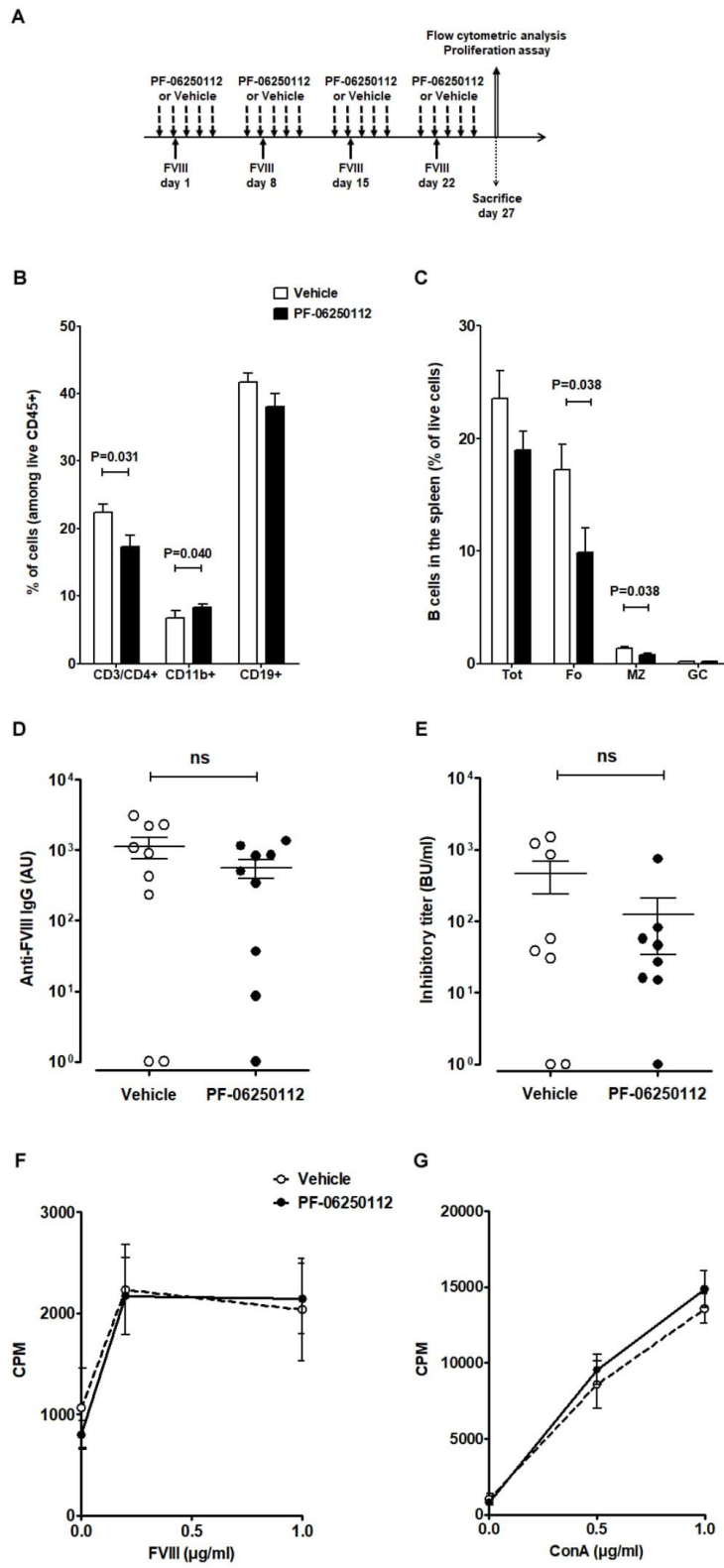
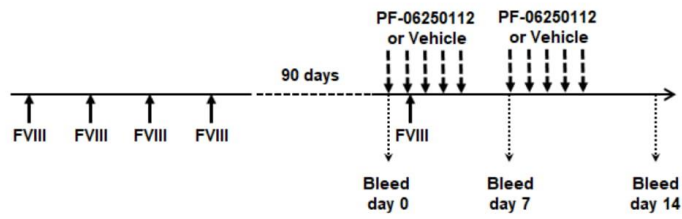
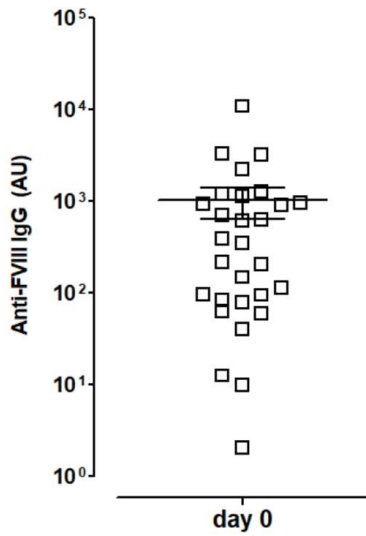


Figure 3

A



B



C

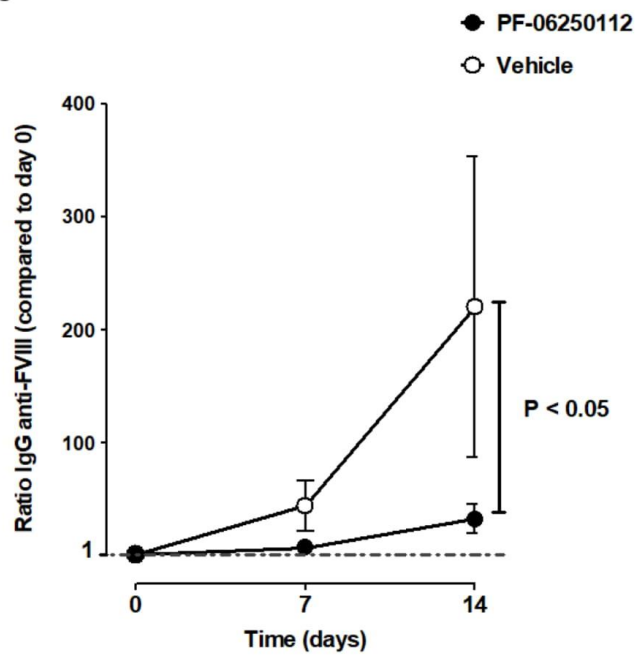
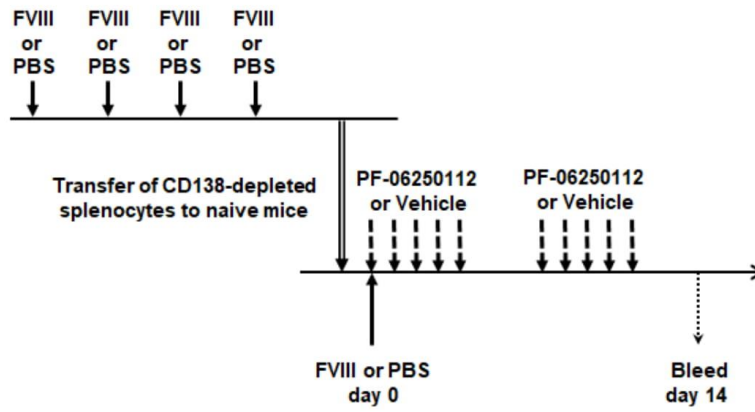


Figure 4

A



B

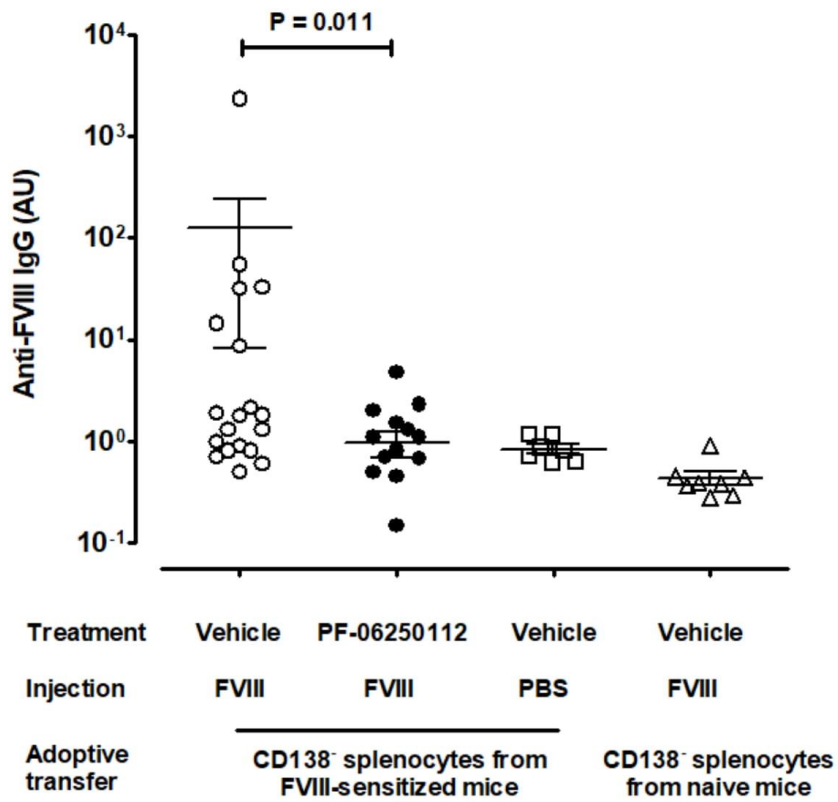
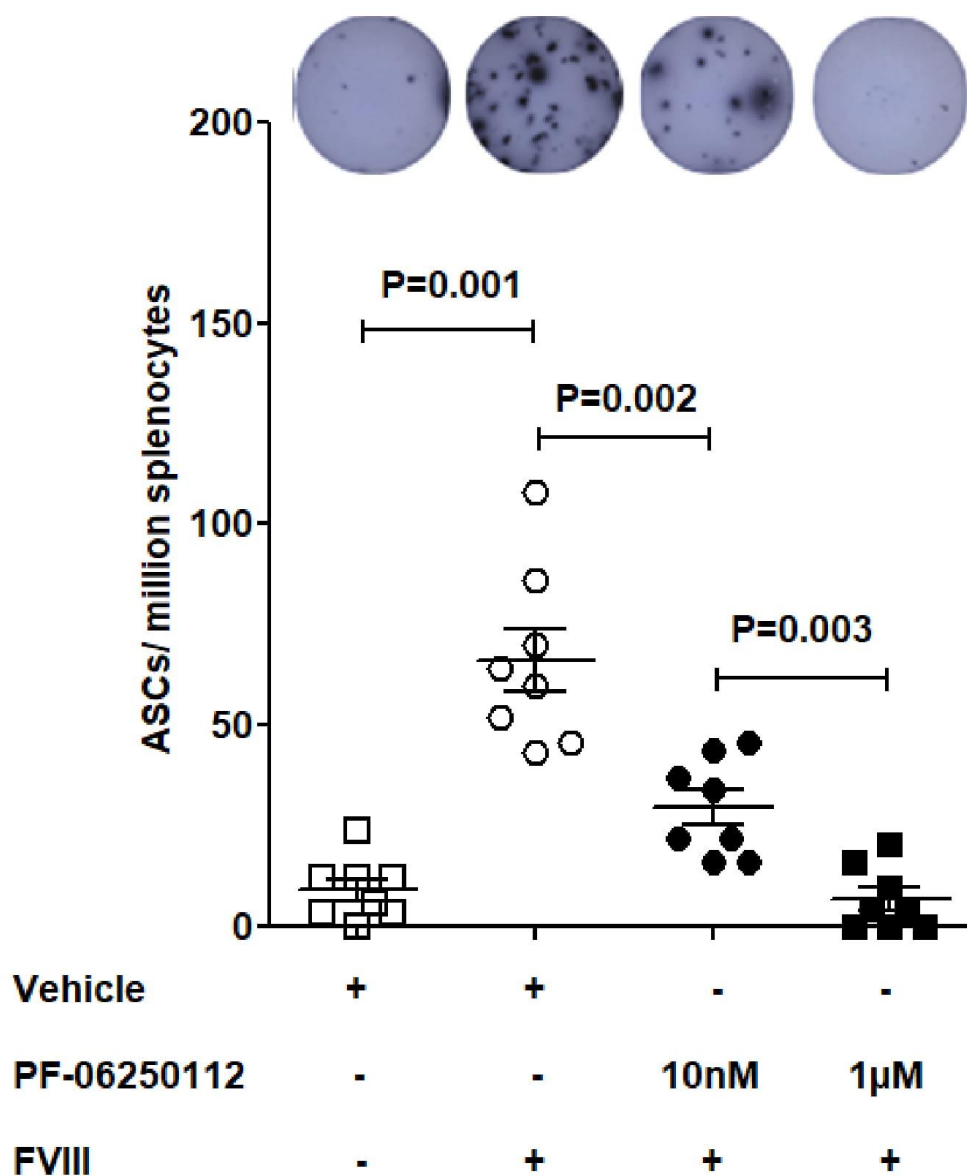


Figure 5



### III. Caractérisation d'un nouveau modèle murin déficient en FVIII et humanisé pour le HLA-DRB1\*01:01

(Non soumis, en préparation)

L'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII est aujourd'hui l'un des sujets primordiaux de la recherche sur l'hémophilie A. Ainsi, de nombreux modèles animaux sont utilisés. Certains ont une hémophilie spontanée, comme le chien, le mouton, le chat ou le cheval<sup>381</sup>. Si l'hémophilie A chez le cheval est plus sévère que ce qui est observé chez l'homme, le chien hémophile A possède le même mode de transmission que l'homme, présente des symptômes cliniques comparables et la fréquence d'apparition des inhibiteurs en réponse au FVIII est identique. Cependant, l'utilisation de ces animaux est compliquée par le nombre d'animaux disponibles, leur entretien et leur coût. Ainsi, des modèles expérimentaux de petits animaux ont été développés. Des modèles d'hémophilie induite ont été générés par injection d'anticorps anti-FVIII, notamment chez le lapin, le singe ou la souris. Si cela cause effectivement une diminution du taux de FVIII circulant, l'hémophilie induite est transitoire. C'est la raison pour laquelle des modèles murins génétiquement modifiés ont été développés<sup>382</sup>.

Des souris ont été invalidées pour le gène *F8* par insertion d'une cassette néomycine dans l'exon 16 (E16) ou 17 (E17). Les deux lignées ainsi obtenues ont des niveaux de FVIII indétectables et l'activité FVIII est inférieure à 1% de l'activité normale du FVIII, mimant un phénotype sévère de la maladie<sup>383</sup>. Si aucun saignement spontané n'est détecté dans ces lignées, elles présentent de nombreux avantages pour l'étude de la réponse anti-FVIII puisque 70 à 100% des souris développent des inhibiteurs après plusieurs administrations intraveineuses de FVIII thérapeutique<sup>333,384</sup>. Les modèles murins invalidés pour le FVIII sont aujourd'hui essentiellement issus de ces deux lignées initiales. Seuls quelques autres modèles ont été développés, notamment celui décrit en 2016 où l'intégralité du gène *F8* est déleté, présentant des caractéristiques similaires aux E16<sup>385</sup>. De plus ces souris, comme les patients, développent une réponse immunitaire au cours de laquelle le FVIII est endocyté, présenté par le CMH II à des LT CD4<sup>+</sup>, conduisant à leur

activation et à la différenciation de LB spécifiques du FVIII en LB mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Cependant, dans ces modèles, ce sont des cellules présentatrices d'antigène murines qui endocytent le FVIII et le présentent sur un CMH II murin. Or, le répertoire de peptides présenté dépend de l'affinité de ces peptides pour le CMH II. Ainsi, le répertoire présenté dans les modèles murins actuels est-il le répertoire correspondant au CMH II murin, reconnu par un TCR murin. Ces modèles ne permettent donc pas l'étude des peptides présentés chez l'homme, de comparer les peptides présentés dans différents contextes (avec/sans vWF, FVIII/FVIIIa...), ni même la validation de molécules de FVIII dans lesquels les épitopes T ont été modifiés.

Les premiers modèles murins humanisés pour le CMH ont été caractérisés dans les années 1990s et exprimaient alors les allèles humains, en plus des allèles murins<sup>386</sup>. Dans ces modèles, la contribution de chacun des CMH étaient difficile à évaluer. Puis le CMH murin a été invalidé et des modèles exprimant uniquement le CMH I humain ont été développés. Ces modèles ont principalement été utilisés pour l'étude de la réponse immunitaire dans des maladies auto-immunes. Ils ont notamment permis de mettre en évidence l'importance des LT CD8<sup>+</sup> dans la sclérose en plaque et le diabète de type I, mais également de détecter des LT auto réactifs vis-à-vis du collagène de type II dans l'arthrite rhumatoïde<sup>387</sup>. Plus récemment, des modèles murins humanisés pour le CMH II ont été utilisés pour identifier des peptides immunodominants (peptides les plus prompts à déclencher une maladie donnée) dans l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, le diabète sucré insulino-dépendant ou encore la maladie cœliaque<sup>388</sup>. Ils ouvrent ainsi la voie au développement d'immunothérapies spécifiques de ces antigènes afin de remplacer les traitements immunosuppresseurs actuels, non spécifiques.

Concernant le FVIII, il y a quelques années, un modèle murin déficient en FVIII, en CMH I et II murins et humanisé pour le CMH II a été développé<sup>389</sup>. Ce modèle exprime l'allèle DRB1\*15:01 du CMH II humain et développe une réponse immunitaire anti-FVIII plus faible que les souris E16. En revanche, la distribution isotypique des inhibiteurs est similaire dans les deux lignées. Ce modèle a permis aux auteurs de générer un peu moins

de 200 hybridomes de LT exprimant des TCR spécifiques de cet allèle et d'identifier 8 régions contenant des épitopes T reconnus par ce CMH.

L'objectif de cette partie de ma thèse était de développer et caractériser un modèle murin d'hémophilie A, invalidé pour les CMH I et II murins, mais exprimant les CMH humains de classe I HLA-A2.1 et de classe II HLA-DRB1\*01:01. En effet, l'allèle 01:01 est un des plus présents dans la population caucasienne et est retrouvé chez 10% des patients hémophiles<sup>144</sup>. J'ai donc commencé par caractériser le système immunitaire des souris naïves en évaluant leurs taux d'IgM et d'IgG, ainsi que le nombre des populations de cellules immunitaires. J'ai alors observé une prévalence des IgM par rapport aux IgG chez les souris naïves, ainsi qu'une diminution des populations de LB folliculaires et des LT CD8<sup>+</sup>, avec pour autant une capacité de prolifération des LT identique à celle des LT de souris FVIII-KO. J'ai alors évalué la réponse immunitaire anti-FVIII dans ce modèle en injectant les souris de manière hebdomadaire avec du FVIII thérapeutique pendant 7 semaines. J'ai ainsi confirmé la moindre capacité des souris transgéniques à développer des IgG anti-FVIII au profit d'une augmentation des IgM anti-FVIII. Cette observation avait déjà été faite dans le cadre des souris transgéniques développées par Steinitz. J'ai ensuite tenté de valider l'expression du CMH II humain sur les LB et les cellules dendritiques mais il semble que ces cellules ne l'expriment pas. En revanche, les LT spécifiques du FVIII ont une capacité normale à proliférer en réponse au FVIII dans des expériences *ex vivo*.

L'ensemble des résultats suggère une altération de la communication entre les LT et les LB dans ce modèle murin. Dans l'étude caractérisant les souris exprimant l'allèle DRB1\*15:01, l'ajout de LPS au FVIII permettait de rétablir les taux d'IgG. Il serait donc intéressant de voir si cette stratégie fonctionne dans notre modèle. Par ailleurs, l'absence de CMH II à la surface des CPA doit être étudiée et la détection de ces molécules en intracellulaire pourrait permettre de valider leur production *in vivo*.

Generation of humanized FVIII-deficient HLA-DRB1\*01:01-transgenic mice

Jules Russick,<sup>1,2,3</sup> Sandrine Delignat,<sup>1,2,3</sup> Yu-Chun Lone,<sup>4</sup> Marc Pallardy,<sup>5</sup> Srinivas V Kaveri,<sup>1,2,3</sup>, Sébastien Lacroix-Desmazes<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France; <sup>2</sup>Sorbonne Université, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France; <sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; <sup>5</sup>INSERM, UMR996, Faculté Pharmacie, Université Paris Sud, France.

Corresponding author

Sébastien Lacroix-Desmazes. INSERM UMR 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France. Tel: +33 1 44 27 82 02. Fax: +33 1 27 81 94. Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count abstract: 255

Word count text: 5122

Number of Tables: 1

Number of Figures: 4

Number of references: 28



### **Abstract**

Replacement therapy in severe hemophilia A patients using therapeutic factor VIII (FVIII) is complicated by the development of inhibitory anti-FVIII IgG, referred to as 'FVIII inhibitors', in 25-30% of the patients. The anti-FVIII immune response is a T-cell dependent response, wherein FVIII is endocytosed by antigen-presenting cells, processed and presented on MHC class II (MHCII) molecules to FVIII-specific CD4+ T cells. T cells then provide help to FVIII-specific B cells that differentiate into plasmocytes and produce the anti-FVIII IgG. The study of the immune response in patients is complicated by the fact that only peripheral blood cells are available. Several FVIII-deficient non-human species exist as models of severe hemophilia A. Among these, FVIII-deficient mice are the best studied. The mouse model however suffers major differences with the human, in particular the fact that human FVIII is presented to T cells on a restricted mouse MHCII haplotype and the repertoire of FVIII-derived peptides presented to T cells is probably much more restricted than that presented by human antigen-presenting cells. Here, we generated exon 16-invalidated FVIII-deficient mice deficient for mouse H-2<sup>b</sup> and I-A<sup>b</sup> and transgenic for HLA-A2.1 and HLA-DRB1\*01:01, referred to as 'HemB6L1 mice'. We found differences in splenic populations of CD8+ T cells and follicular B cells as compared to FVIII-deficient (HemB6) mice. The immune response to human therapeutic FVIII was characterized by an impaired anti-FVIII IgG response, and conserved levels and reactivity of splenic FVIII-specific T cells. The data point to a default in T-cell/B-cell communication associated with a poor expression of the HLA-DRB1\*01:01 transgene.

### **Keywords**

Hemophilia A, factor VIII, FVIII inhibitors, FVIII immunogenicity, animal models

### Introduction

Hemophilia A is a rare X-linked hemorrhagic disorder due to insufficient levels of pro-coagulant factor VIII (FVIII)<sup>1</sup>. The prevention or treatment of bleedings depend on the administration of exogenous therapeutic FVIII. In 25 to 30% of the patients with the severe form of the disease, however, neutralizing anti-FVIII IgG, referred to as 'FVIII inhibitors' develop against the exogenous therapeutic protein<sup>2</sup>. Several genetic risk factors have been associated with the development of FVIII inhibitors, including the familial history of an inhibitor, the type of hemophilia A-causing gene mutation, the severity of the disease, HLA-DR haplotypes and polymorphisms in the promoters of genes encoding inflammatory mediators<sup>3-10</sup>. It is nevertheless impossible to predict with certainty whether a patient will develop inhibitory antibodies, and strategies to induce active immune tolerance to FVIII in the patients have not reach clinical practice yet. The immune response to therapeutic FVIII is believed to be a classical CD4+ T cell-dependent response to an exogenous antigen, wherein the administered FVIII is endocytosed by professional antigen presenting cells, processed and presented on MHC class II (MHCII) molecules to naïve FVIII-specific T cells that are activated, provide help to FVIII-specific B cells leading to their differentiation into plasmocytes and production of neutralizing anti-FVIII IgG. The study of the immune response in patients is complicated by the fact that the only accessible immune cells are obtained from peripheral blood and the study of immune effectors present in secondary lymphoid organs is not possible. Several animal models of hemophilia A have thus been used to decipher the different stages of the immune response *in vivo*<sup>11,12</sup>.

Using FVIII-deficient mice, a model of severe hemophilia A with undetectable levels of FVIII, we and others have shown that the endogenously administered FVIII accumulates in the marginal zone of the spleen at the level of macrophages and that the spleen is essential for the initiation of the anti-FVIII immune response<sup>13-15</sup>. The role for CD4+ T cells in the initiation and maintenance of the anti-FVIII immune response was demonstrated in mice<sup>16-18</sup>. FVIII-deficient mice are a good surrogate for human studies with respect to the nature and functions of the repertoire of anti-FVIII IgG that are generated<sup>19</sup>. Yet, the model suffers from major differences with the human, including the facts that the immune response develops in  $\geq 70\%$  of the treated animals, is initiated by a heterologous (human FVIII) molecule, and that the distribution of the proposed endocytic receptors for FVIII on antigen-presenting cells and in varied tissues is different in human and mice<sup>20,21</sup>. More specifically, human FVIII is presented in the context of a mouse MHCII to CD4+ T cells expressing mouse T-cell receptors thus hampering the detailed *in vivo* analysis of the repertoire of FVIII-derived peptides presented to T cells. Accordingly,

the model is not appropriate to validate genetically modified FVIII molecules where major T-cell epitopes for human leukocyte antigens (HLA) are altered.

Several years ago, a humanized mouse model of FVIII-deficient mice expressing the human HLA-DRB1\*15:01 was developed<sup>22</sup>. The model allowed the generation of T-cell hybridomas specific for human FVIII presented by the HLA-DRB1\*15:01 allele and identification of the targeted peptides. In the present work, we generated and characterized a novel humanized mouse model of FVIII-deficient mice expressing the human HLA-DRB1\*01:01 by crossing exon 16-invalidated hemophilic C57Bl/6<sup>23</sup> with mice invalidated for the mouse MHC I (H-2<sup>-/-</sup>) and for the mouse MHC II (I-A<sup>-/-</sup>) and transgenic for the human MHC I HLA-A\*02:01 allele and MHC II HLA-DRB1\*01:01 allele<sup>24</sup>.

### **Material and methods**

#### **Humanized HLA-DRB1\*01:01 FVIII-deficient mice**

Exon 16-invalidated FVIII-deficient mice on the C57Bl/6.J background (obtained from Prof H.H. Kazazian, Department of Genetics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, US)<sup>23</sup>, referred to as HemB6 mice, were crossed with HLA-DRB1\*01:01, HLA-A2 transgenic mice, that are deficient for mouse MHC I and MHC II molecules<sup>24</sup>. For genotyping, genomic DNA was isolated from a small piece of ear using genomic DNA blood and cell culture kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer recommendations. The presence of HLA-DRB1\*01:01, HLA-A\*02:01 transgenes, as well as the deficiency in FVIII, H-2 class II (IA-Beta) and H-2 class I (Beta-2m) genes were validated by PCR. PCR conditions were 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U of Taq Polymerase, buffer supplied by the manufacturer (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA); 1 cycle (7 min, 94°C), 40 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 56°C; 1 min, 72°C), 1 cycle (4 min, 72°C) using forward and reverse primers (supplementary Table 1). To determine homozygosity of HLA-DRB1, HLA-DRA1 and HLA-A2 transgenic mice, an intermediate mating with wild-type C57Bl/6.J mice was performed to check for the transgene transmission frequency.

#### **Mice treatment**

Mice were 7 to 11-week old FVIII-deficient C57BL/6 (HemB6) or humanized HLA-DRB1\*01:01 FVIII-deficient (HemB6L1) mice. Mice were injected intravenously (iv) or subcutaneously (sc) with recombinant full length FVIII (Helixate®, CSL-Behring, 1 µg/mouse) once a week for seven weeks. Blood was collected from retro-orbital sinus 4 days after each

injection. Serum was kept frozen at -80°C until use. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (Comité Charles Darwin, ethical authorization #2058.04).

### **Quantification of immunoglobulins**

*Total IgM/IgG.* ELISA plates (Nunc MaxiSorp, Thermofisher) were coated with a goat anti-mouse kappa chain antibody (1050-01, Southern Biotech, Birmingham, USA) at 1 µg/mL in phosphate buffer saline (PBS) for 1 hr at 37°C. Wells were saturated using 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS and serial dilutions of serum were incubated for 1 hr at 37°C. Total IgM in the serum were detected using a goat anti-mouse IgM-HRP and IgG by a goat anti-mouse IgG-HRP (1020-05 or 1030-05, respectively, Southern Biotech) and revealed by HRP o-Phenylenediamine Dihydrochloride substrate (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Optical density was read at 492 nm. IgG and IgM concentrations were calculated using wild-type C57B/6 plasma as a standard.

*Anti-FVIII IgM/IgG.* ELISA plates (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific) were coated with full length FVIII (Advate®) at 1 µg/mL in Bicarbonate buffer for 1 hr at 37°C. Wells were saturated using 3% BSA in PBS and serial dilutions of serum were incubated for 1 hr at 37°C. Anti-FVIII IgM in the serum were first detected using a goat anti-mouse IgM-AP (1020-04, Southern Biotech) revealed by p-Nitrophenyl (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and optical densities (OD) were read at 405 nm. Anti-FVIII IgG were then detected using a goat anti-mouse IgG-HRP (1030-05, Southern Biotech) revealed by OPD. Optical densities were read at 492 nm. Anti-FVIII IgM are expressed in arbitrary units as a function of the OD. Anti-FVIII IgG concentrations were calculated using the mouse monoclonal anti-FVIII IgG, mAb6 (a kind gift from Prof JM Saint-Remy, KUL, Leuven, Belgium), as a standard.

### **Flow cytometry**

Spleens from naïve or immunized mice were incubated in a DNase/Liberase solution (Roche, Indiana, USA) at 0.1 µg/mL and 0.4 µg/mL, respectively, for 30 min at 37°C. Spleen were then mechanically dilacerated on a 100 µm cell strainer and washed. Splenocytes were incubated 90 s in ACK Lysis Buffer (Life Technologies™, Invitrogen) at room temperature, passed through a 70 µm cell strainer and resuspended in RPMI-1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin. Phenotypic analyses were performed using anti-IA<sup>d</sup>/IE<sup>d</sup>-FITC (comparable reactivity on cells from mice with I-A<sup>b</sup> alloantigens), anti-HLA-DR-FITC, anti-HLA-DR-APC, anti-CD45R/B220-PE, anti-

CD19-PE Cy7, anti-CD3-PE, anti-CD8-PerCP, anti-CD4-Alexa Fluor 700, anti-CD11b-PE (all BD Pharmingen, San Jose, USA), anti-CD21/35-Pacific Blue, anti-CD93-APC, anti-CD11c-Pacific Blue, anti-CXCR5-PE Cy7 (all BioLegend, San Diego, USA) and anti-F4/80-APC (eBiosciences, San Diego, CA, USA). Cell subsets were then characterized as: B cells (CD19<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>), follicular (Fo) B cells (CD19<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>, CD93<sup>-</sup>, CD21/35<sup>low</sup>), marginal zone (MZ) B cells (CD19<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>, CD93<sup>high</sup>, CD21/35<sup>-</sup>), transitional 1 (T1) B cells (CD19<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>, CD93<sup>+</sup>, CD21/35<sup>-</sup>), transitional 2 (T2) B cells (CD19<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>, CD93<sup>+</sup>, CD21/35<sup>+</sup>), dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>, F4/80<sup>-</sup>), macrophages (CD11c<sup>-</sup>, F4/80<sup>+</sup>), monocytes (CD11c<sup>-</sup>, F4/80<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>), T cells (CD3<sup>+</sup>), CD4 T cells ("CD4<sup>+</sup>": CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>), CD8 T cells ("CD8<sup>+</sup>": CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), follicular T helper (Tfh, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup>). The expression of mouse MHCII H-2 IA was detected at the surface of B cells and DCs FACS analysis was done on live cells using BD LSRII and FACSDiva or FlowJo softwares.

### **Proliferation of splenocytes**

Spleens were recovered from mice injected 7 times with FVIII, three days after the last injection. Splenocytes (250.000 cells) isolated as previously described were incubated in 96-round well plates (Nunclon Delta Surface, Thermo Fischer Scientific) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS),  $\beta$ -mercaptoethanol (50  $\mu$ M), 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 1% non-essential amino acids, alone, with concanavalin A (0.5  $\mu$ g/ml Sigma) or with FVIII (0.1  $\mu$ g/ml). After 72h of incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ Ci of tritiated thymidine (<sup>3</sup>H) was added to each well for an overnight incubation. Cells were then recovered (TOMTEC, Hamden, USA) and <sup>3</sup>H incorporation quantified by Beta counter (MicroBeta 1450, Perkin Elmer, Whaltam, USA).

## Results

### Reduced levels of IgG in naïve HemB6L1 mice

We first compared naïve HemB6L1 with naïve HemB6 mice with respect to the levels of circulating IgM, IgG, numbers of different cell populations in the spleen and capacity of the splenic T cells to proliferate in the presence of ConA. Naïve 7-11-week old mice were bled and levels of IgM and IgG were measured in serum by ELISA. Normal concentrations of IgM and IgG in the serum of wild-type C57B/6 mice are comprised between 800-6500 µg/mL and 2000-5000 µg/mL, respectively. Accordingly, the concentrations of IgM (Figure 1A) and IgG (Figure 1B) in the serum of HemB6 mice were  $4459 \pm 1044$  µg/mL and  $3631 \pm 776$  µg/mL, respectively (means  $\pm$  SEM). In contrast, the concentration of IgM in the serum of HemB6L1 was drastically increased as compared to HemB6 mice ( $33399 \pm 4903$  µg/mL,  $p < 0.0001$ ) and that of IgG was decreased by more than 10 folds ( $241 \pm 31$  µg/mL,  $p < 0.0001$ ).

We then investigated whether the altered Ig production in HemB6L1 mice is associated with modifications in the distribution of splenic cells from the innate and/or adaptive immune compartments. Splenocytes were purified from the spleen of naïve mice and analysed by flow cytometry. We quantified the number of antigen-presenting cells (APC), B cells and T cells subsets by flow cytometry. The number of APCs was not affected in HemB6L1 mice as compared with HemB6 mice (monocytes:  $2.76 \pm 0.75 \cdot 10^6$  vs  $2.41 \pm 0.34 \cdot 10^6$  cells, dendritic cells:  $1.09 \pm 0.24 \cdot 10^6$  vs  $0.93 \pm 0.14 \cdot 10^6$  cells, macrophages:  $1.20 \pm 0.47 \cdot 10^6$  vs  $1.05 \pm 0.14 \cdot 10^6$  cells; Figure 2A). Likewise, the numbers of total T cells, helper T cells and follicular helper T cells were identical in HemB6 and HemB6L1 mice (Figure 2C). There was however a statistically significant 10-fold decrease in the number of CD8+ cytotoxic T cells in HemB6L1 mice as compared with HemB6 mice ( $0.68 \pm 0.16 \cdot 10^6$  vs  $7.18 \pm 1.03 \cdot 10^6$  cells, Figure 2C). The significant increase in the number of splenic B cells in HemB6L1 mice as compared with HemB6 mice ( $17.0 \pm 1.5 \cdot 10^6$  vs  $8.7 \pm 0.7 \cdot 10^6$  cells; Figure 2B) was essentially due to a significant increase in numbers of follicular B cells ( $16.2 \pm 1.5 \cdot 10^6$  vs  $8.1 \pm 0.7 \cdot 10^6$  cells for HemB6L1 and HemB6 mice, respectively). Numbers of marginal zone B cells and of transitional B cells 1 and 2 were identical in HemB6L1 mice and HemB6 mice. Interestingly, the capacity of splenic T cells to proliferate in response to the lectin mitogen concanavalin A did not differ between HemB6 and HemB6L1 mice (Figure 2D, stimulation index (SI):  $4.17 \pm 0.66$  vs  $6.11 \pm 0.86$ , respectively).

**Immune response to therapeutic FVIII in HemB6L1 mice**

Naïve HemB6 and HemB6L1 mice were injected either sc or iv with human FVIII once a week for seven weeks and anti-FVIII Ig were quantified in the serum (Figures 3A, 3B). Anti-FVIII IgM (Figure 3A) were detected in the serum from HemB6 mice after 3 injections and were significantly greater when FVIII was injected iv ( $14.9 \pm 1.1$  AU) as compared to sc ( $1.0 \pm 0.3$  AU,  $p < 0.01$ ). The levels of anti-FVIII IgM in HemB6L1 mice were also greater in the iv route as compared with the sc route ( $9.1 \pm 1.5$  vs  $2.7 \pm 0.5$ , respectively,  $p < 0.001$ ) and were greater (sc,  $p < 0.01$ ) or equivalent (iv,  $p = 0.057$ ) to that measured in HemB6 mice, indicating that HemB6L1 mice are not impaired in the development of anti-FVIII IgM immune responses.

In agreement with data in naïve mice, levels of anti-FVIII IgG were greater in HemB6 mice than in HemB6L1 mice both after three (26 folds) and seven FVIII injections (41 and 130 folds for sc and iv, respectively; Figure 3B). Thus, after seven FVIII injections, sc injected HemB6 and HemB6L1 mice presented with  $37.8 \pm 6.6$  and  $0.9 \pm 0.4$  mg/ml anti-FVIII IgG ( $p < 0.0001$ ), whereas iv injected mice presented with  $17.2 \pm 5.8$  and  $0.1 \pm 0.1$  mg/ml anti-FVIII IgG, respectively ( $p < 0.0001$ ). After the 7<sup>th</sup> injection of FVIII, HemB6 mice developed greater levels of anti-FVIII IgG when injected sc rather than iv ( $p < 0.05$ ). This was also the case for HemB6L1 mice ( $p < 0.01$ ).

**Cross-talk between APCs and T cells in HemB6L1 mice**

In order to investigate whether the altered production of anti-FVIII IgG in HemB6L1 is due to an impaired reactivity of FVIII-specific T cells, we investigated the capacity of splenocytes from mice treated with seven FVIII injections to proliferate in the presence of FVIII. As shown in naïve mice, splenocytes from the spleen of the two strains of mice proliferated in the presence of ConA (Figure 3C). T cells from HemB6 mice proliferated more vigorously in the presence of FVIII when mice had been injected sc as compared to iv (SI:  $5.6 \pm 0.9$  vs  $1.7 \pm 0.2$ , respectively,  $p < 0.001$ ) (Figure 3D). This was also the case for HemB6L1 mice (SI:  $5.0 \pm 0.4$  vs  $1.4 \pm 0.1$ , respectively,  $p < 0.0001$ ). Interestingly, irrespective of the FVIII injection route, splenocytes from HemB6 and HemB6L1 mice proliferated identically in the presence of FVIII, suggesting that the priming of T cells in HemB6L1 mice is not perturbed.

We then investigated the expression of the transgenic human MHCII by dendritic cells and B cells in the spleen of naïve 7-11-week old HemB6L1 mice by flow cytometry (Figure 4). B cells and DCs from naïve HemB6 mice strongly expressed the mouse MHCII H-2 IA<sup>b</sup> and, as expected, did not express HLA-DR (top panels). PBMCs, used as a positive control for the expression of HLA-DR, tested positive for HLA-DR and negative for H-2 IA<sup>b</sup> (bottom panels).

In agreement with genotyping data (not shown), HemB6L1 mice did not express mouse MHCII on B cells or on DCs (middle panels). However, and in contrast to the expected results, the mice failed to express HLA-DR on the two types of APCs.

### Discussion

The objective of the present work was to generate a novel model of humanized FVIII-deficient mice. To this end, we crossed exon 16-invalidated FVIII-deficient mice on the C57BL/6 background with SureL1 mice that lack mouse MHC I and MHC II and express human HLA-A2 and HLA-DRB1\*01:01. While the HLA-DRB1\*01:01 allele, in contrast to the HLA-DRB1\*15:01, has not been identified as a predictive risk factor for the development of FVIII inhibitors in patients<sup>3,4,25</sup>, our decision to use DRB1\*01:01 was motivated by the facts that i) the DRB1\*01:01 allele is prevalent in the general European Caucasian population and in the population of hemophilia patients (about 10%)<sup>25</sup>, ii) the HLA-DRB1\*01:01 transgenic mice were available<sup>24</sup> and iii) the humanized HLA-DRB1\*15:01 FVIII-deficient have already been generated<sup>22</sup>. Genotyping analyses confirmed that the generated HemB6L1 mice lack the genes encoding mouse FVIII, MHC I and MHC II and contain the transgenes encoding the human MHC I and II proteins. An analysis of the immune system of naïve HemB6L1 mice revealed the presence in the circulation of exacerbated levels of IgM and reduced levels of IgG, with a normal proliferative capacity of splenic T cells upon stimulation with ConA. Together, these observations suggest an unaltered functionality of T cells in the mice and a potential impaired cross-talk between antigen-presenting cells and T cells leading to a default in isotype switch from IgM to IgG under steady conditions. HemB6L1 mice presented with unaltered splenic populations of DCs, macrophages, monocytes and CD4+ T cells as compared with the parent HemB6 mice, but with exacerbated levels of splenic follicular B cells and a drastic decrease of CD8+ T cells, as compared to HemB6 mice.

The altered capacity of HemB6L1 mice to develop antigen-specific IgG immune responses was confirmed upon treatment of the mice with human therapeutic FVIII. While the levels of anti-FVIII IgM were greater in HemB6L1 mice as compared with HemB6 mice, that of anti-FVIII IgG were drastically reduced. A reduced IgG response to human FVIII had been already reported in the DRB1\*15:01 FVIII-deficient mice<sup>22</sup>. In the latter work, the iv administration of FVIII induced statistically lower levels of anti-FVIII IgG in HLA-DR transgenic mice as compared to the parental mouse MHCII-positive mice. This difference in anti-FVIII IgG responses was associated with an unaltered diversity of the repertoire of T-cell receptors (TcR)



of CD4+ T cells<sup>22</sup>. Interestingly, the iv injection of FVIII in the presence of LPS rescued levels of anti-FVIII IgG similar to that obtained in the parental FVIII-deficient mice, indicating that the concomitant activation of the innate immune system may retrieve normal levels of immune responses in HLA-DR transgenic animals. Whether LPS treatment of HemB6L1 mice at the time of FVIII injection may restore an unbiased anti-FVIII IgG response remains to be investigated.

Our attempt to confirm the expression of the HLA-DRB1\*01:01 at the surface of APCs in the spleen of HemB6L1 mice was unsuccessful. This was unexpected because i) parent SureL1 mice had been confirmed to express the transgenic protein (not shown), ii) FVIII-specific and ADAMTS13-specific HLA-DRB1\*01:01-restricted T-cell hybridomas have been generated from the parent SureL1 mice following immunization of the animals with FVIII or ADAMTS13 in the presence of adjuvant<sup>26,27</sup> and iii) the presence of the transgene was confirmed by genotyping. Interestingly, HLA-DRB1\*01:01 was detected neither on B cells, dendritic cells or monocytes (not shown). Yet, splenic FVIII-specific T cells proliferated normally in the presence of FVIII when incubated with splenic APCs, indicating that the activation of naïve FVIII-specific T cells occurred in the mice and that splenic APCs are able to present FVIII to activated FVIII-specific T cells in *ex vivo* proliferation assays. Together with the above observations, the reduced production of anti-FVIII IgG suggests a deficient T-cell/APC cross-talk that preferentially targets interactions between B lymphocytes and CD4+ T cells rather than interactions between DCs and T cells.

Seminal work by the Reipert group has demonstrated that the immunogenicity of FVIII is similar following iv or sc administration to exon 17-invalidated FVIII-deficient mice<sup>28</sup>. In agreement with the work on HLA-DRB1\*15:01 FVIII-deficient mice however<sup>22</sup>, we observe that the sc administration of FVIII was associated with a 10-fold increase in the anti-FVIII IgG response in the HLA-DRB1\*01:01 FVIII-deficient HemB6L1 mice, as compared to iv injections. Whether this suggest that the cross-talk between T cells and APCs in HemB6L1 mice is more efficient in draining lymph nodes than in the spleen remains to be determined. In the future, the presence of the HLA-DRB1\*01:01 protein will be investigated intracellularly in the different types of APCs as well as at the cell surface following *in vitro* activation in the presence of LPS or pro-inflammatory cytokines such as type 1 interferon.

#### Acknowledgements

This work was supported by INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique and Sorbonne Université (Paris, France) and by the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking ABIRISK (Anti-Biopharmaceutical Immunization Risk) project under grant agreement #115303, the resources of which comprise financial contribution from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) and in-kind contributions from European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations companies. JR was the recipient of a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France).

### **Authors contribution**

JR, SD, BM, YCL, SVK, SLD designed research

JR, SD performed research

JR, SD, SLD analyzed data

JR, SD, SLD wrote the paper

### **Conflict-of-interest disclosure**

None of the authors has a conflict of interest related to this work

**References**

1. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1773-1779.
2. 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.
3. Hay CR, Ollier W, Pepper L, et al. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost.* 1997;77(2):234-237.
4. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost.* 1997;77(2):238-242.
5. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, 2nd, Berntorp E. The Malmo International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica.* 2005;90(7):924-931.
6. Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, et al. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood.* 2013;121(8):1446-1454.
7. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 2006;108(12):3739-3745.
8. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 2006;107(8):3167-3172.
9. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007;5(2):263-265.
10. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood.* 2012;119(12):2922-2934.
11. Lozier JN, Nichols TC. Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin Hematol.* 2013;50(2):175-184.
12. Yen CT, Fan MN, Yang YL, Chou SC, Yu IS, Lin SW. Current animal models of hemophilia: the state of the art. *Thromb J.* 2016;14(Suppl 1):22.
13. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2009;7(11):1816-1823.

14. van der Flier A, Liu Z, Tan S, et al. FcRn Rescues Recombinant Factor VIII Fc Fusion Protein from a VWF Independent FVIII Clearance Pathway in Mouse Hepatocytes. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124930.
15. Lai JD, Cartier D, Hartholt RB, et al. Early cellular interactions and immune transcriptome profiles in human factor VIII-exposed hemophilia A mice. *J Thromb Haemost*. 2018;16(3):533-545.
16. Qian J, Borokov M, Bi L, Kazazian HH, Hoyer LW. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost*. 1999;81:240-244.
17. Qian J, Burkly L, Smith E, et al. Role of CD154 in the secondary immune response: the reduction of pre-existing splenic germinal centers and anti-factor VIII inhibitor titer. *Eur J Immunol*. 2000;30:2548-2554.
18. Rossi G, Sarkar J, Scandella D. Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood*. 2001;97:2750-2757.
19. Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Langley TJ, Church WR, Lollar P. The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost*. 2007;5(3):512-519.
20. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012;92(6):1177-1186.
21. Burgdorf S, Schuette V, Semmling V, et al. Steady-state cross-presentation of OVA is mannose receptor-dependent but inhibitable by collagen fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(13):E48-49; author reply E50-41.
22. 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 E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood*. 2012;119(17):4073-4082.
23. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH, Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A [letter]. *Nat Genet*. 1995;10(1):119-121.
24. Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol*. 2004;34(11):3060-3069.
25. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, et al. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009;7(12):2006-2015.
26. Delignat S, Repesse Y, Gilardin L, et al. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemophilia*. 2014;20(4):486-492.

27. Gilardin L, Delignat S, Peyron I, et al. The ADAMTS13(1239-1253) peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4(+) T-cell epitope. *Haematologica*. 2017;102(11):1833-1841.
28. Reipert BM, Ahmad RU, Turecek PL, et al. Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. *Thromb Haemost*. 2000;84(5):826-832.

### Figures & Legends

**Figure 1. Ig production in naïve transgenic mice.** Total IgM (Panel A) and IgG (Panel B) were measured in the serum of HemB6 (full circles) or HemB6L1 (empty squares) mice by ELISA. Expected ranges of IgM and IgG titers in the serum of C57BL6 mice are depicted as dotted lines. Horizontal bars depict means±SEM and individual dots represent single mice. Differences were assessed using the non-parametric double-sided Mann-Whitney test (\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

**Figure 2. Immunological characterization of naïve transgenic mice.** Panels A, B and C. Splenocytes from HemB6 and HemB6L1 mice were isolated and stained for flow cytometry analysis. The total number of each cell type was assessed on viable cells in the case of dendritic cells (DCs), macrophages (Macros) and monocytes (Monos) (Panel A), B-cell subpopulations (Panel B), T-cell subpopulations (Panel C). Horizontal bars depict means±SEM for 3 mice per group (Fo: follicular; MZ: marginal zone, Tfh: T follicular helper). Panel D. Splenocytes from naïve HemB6 (full circles) or HemB6L1 (empty squares) mice were stimulated with concanavalin A (ConA, 0.5 µg/mL). The stimulation index (SI) was calculated for each sample by dividing the CPM measured under stimulated conditions by CPM measured without stimulation. Horizontal bars depict means±SEM. Differences were assessed using the non-parametric double-sided Mann-Whitney test (ns: non-significant; \*\*:  $p < 0.01$ ).

**Figure 3. Immune response to therapeutic FVIII in HemB6L1 mice.** Panels A and B. HemB6 (full symbols) or HemB6L1 (empty symbols) mice were injected with FVIII (4 IU or 1 µg) subcutaneously (sc, triangles) or intravenously (iv, diamonds) ones a week for up to seven weeks. Anti-FVIII IgM (Panel A) and anti-FVIII IgG (Panel B) were measured in serum before

FVIII injection and after the third and/or seventh injections by ELISA. Anti-FVIII IgM levels were determined using naïve C57BL6 mouse serum as a standard and are depicted as optical density (OD) measured at 405 nm. Anti-FVIII IgG levels were measured using the human monoclonal anti-FVIII IgG mAb6 and are expressed in  $\mu\text{g/ml}$ . Horizontal bars depict means $\pm$ SEM and individual dots on panel A represent individual mice. Differences were assessed using the non-parametric double-sided Mann-Whitney test (ns: non-significant; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*\*:  $p<0.0001$ ). Panels C and D. HemB6 (full symbols) or HemB6L1 (empty symbols) mice were injected with FVIII subcutaneously (sc, triangles) or intravenously (iv, diamonds) ones a week for seven weeks. Mice were sacrificed 3 days after the last FVIII injection and splenocytes were purified. Cells (250.000) were incubated for 72 hr with concanavalin A (ConA, 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , Panel C) or FVIII (0.1  $\mu\text{g/mL}$ , Panel D). Proliferation was assessed by incorporation of tritiated thymidine for another 18 hr. The stimulation indexes (SI) were calculated by dividing the CPM in stimulated conditions by CPM without stimulation for each sample. Differences were assessed using the double-sided Mann-Whitney test (ns: non-significant; \*:  $p<0.05$ ).

**Figure 4. Human MHC II expression.** Panel E. The expression of mouse (H-2 IA<sup>b</sup>) and human (HLA-DR) MHC class II by splenocytes from naïve HemB6 (top panels) and naïve HemB6L1 (middle panels) mice was determined on B cells (left panels) and dendritic cells (DCs, right panels). Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were used as positive control for HLA-DR expression (PBMC, bottom panels). Values in the top left corner of each panel represent geometric means $\pm$ SEM. Data are from one representative animal per group.

Figure 1

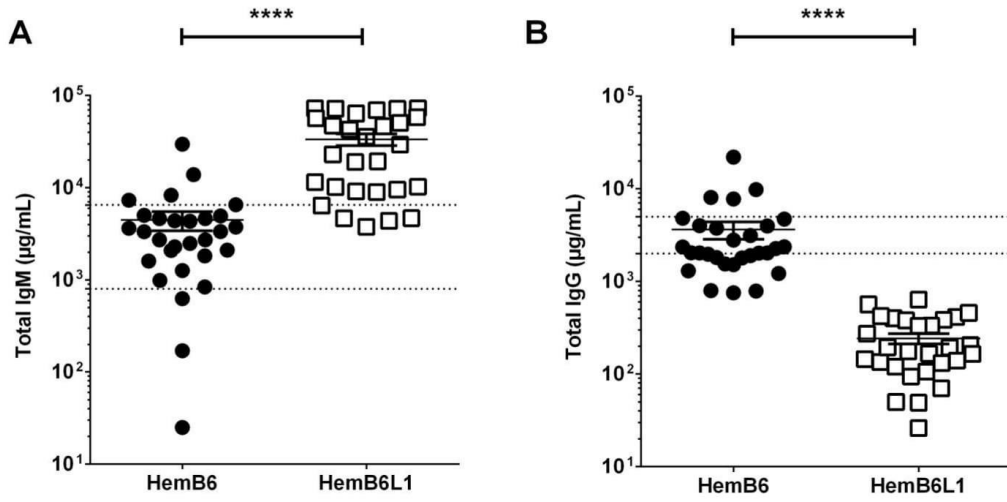


Figure 2

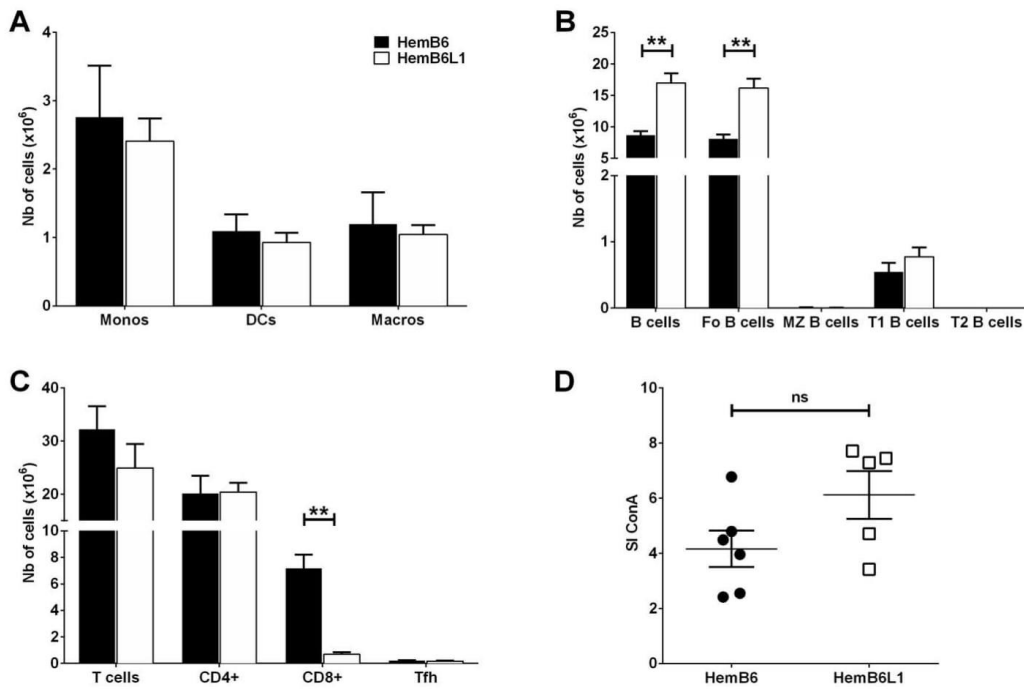


Figure 3

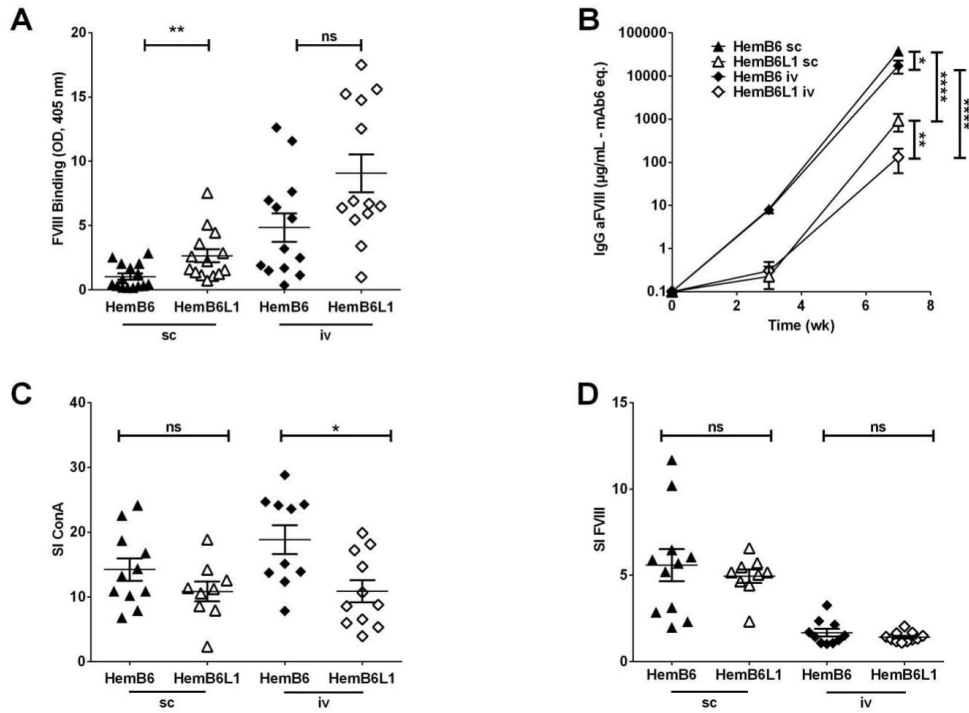
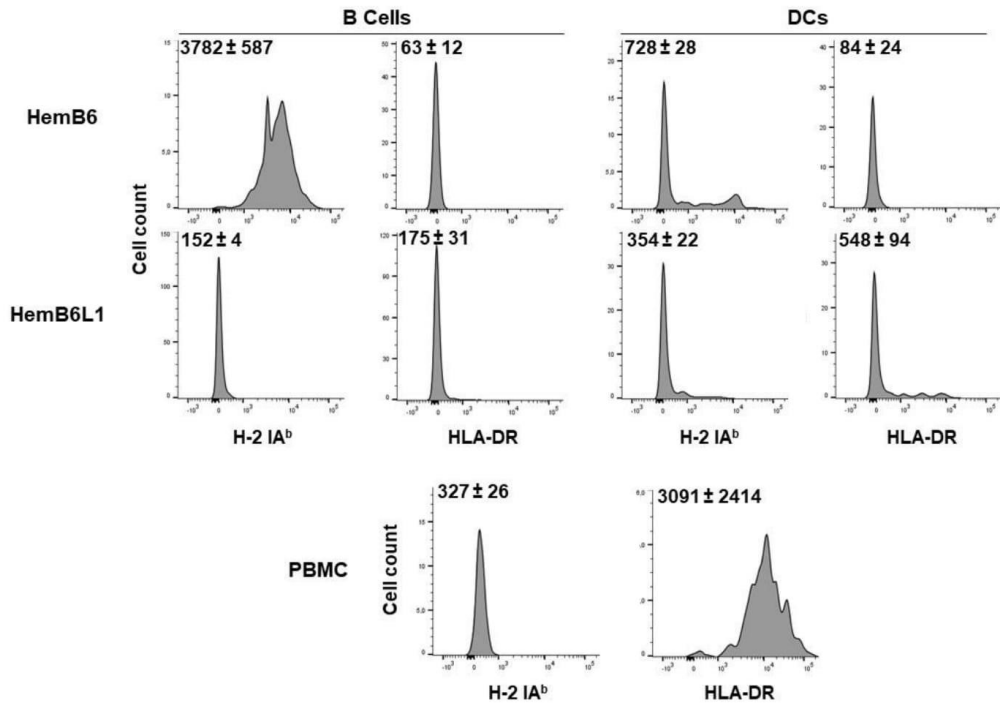


Figure 4





**Supplemental material**

**Supplementary Table 1.** Primers used for PCR to validate deficiencies or transgenes in humanized HLA-DRB1\*0101 FVIII-deficient (HemB6L1) mice

Gene	Primers (5' -> 3')
IA $\beta$	TTC GTG TAC CAG TTC ATG GG
	TAG TTG TGT CTG CAC ACC GT
	CCT GCC GAG AAA GTA TCC A
$\beta$ 2m	CTG AGC TCT GTT TTC GTC TG
	CTT AAC TCT GCA GGC GTA TG
	CCT GCC GAG AAA GTA TCC A
HLA-A2	CAT TGA GAC AGA GCG CTT GGC ACA GAA GCA G
	GGA TGA CGT GAG TAA ACC TGA ATC TTT GGA GTA CGC
HLA-DRA1	CTC CAA GCC CTC TCC CAG AG
	ATG TGC CTT ACA GAG GCC CC
HLA-DRB1	TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG
	CTG CAC TGT GAA GCT CTC ACC AAC
FVIII	GAG CAA ATT CCT GTA CTG AC
	TGC AAG GCC TGG GCT TAT TT
	TGT GTC CCG CCC CTT CCT TT

# DISCUSSION

La prise en charge des patients atteints d'hémophilie A reste, en 2018, très compliquée. Non seulement le traitement est coûteux, mais il ne permet pas d'offrir aux patients une qualité de vie optimale. La courte demi-vie du FVIII les contraint à des injections plusieurs fois par semaine et 25 à 30% d'entre eux développent des inhibiteurs. Les stratégies d'induction de tolérance immunitaire (ITI) mises en place pour répondre à l'impasse thérapeutique représentée par ces inhibiteurs engendrent une augmentation de la fréquence d'injection, dégradant d'autant les conditions de vie et augmentent le coût pour la société.

Ainsi, le développement de nouvelles stratégies alternatives à la thérapie de substitution est essentiel afin d'éviter le développement d'inhibiteurs. En parallèle, la compréhension des mécanismes immunitaires qui régissent la génération de ces anticorps permettrait de développer des stratégies pour les éliminer et ainsi améliorer la prise en charge des patients avec inhibiteurs. C'est dans ce contexte qu'au cours de ma thèse, je me suis attaché à proposer et valider une nouvelle stratégie pour corriger le phénotype hémorragique des patients via l'injection d'ARNm codant le FVIII (article 1). Dans un deuxième temps et en collaboration avec Sandrine Delignat, j'ai étudié la possibilité d'empêcher la production d'inhibiteurs par inhibition des LB spécifiques du FVIII (article 2). Enfin, la dernière partie de ma thèse a été consacrée à caractériser un nouveau modèle murin d'hémophilie A, humanisé pour les CMH I et II, constituant un nouvel outil pour l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII (article 3).

## **I. Correction des saignements par injection d'ARNm codant le FVIII dans un modèle murin d'hémophilie A**

Les limites de la thérapie de substitution utilisant du FVIII thérapeutique, décrites précédemment, rendent le besoin de thérapie alternative pressant. Le caractère monogénique de l'hémophilie A et le diagnostic précoce des patients, même sans antécédents familiaux, font de cette maladie un candidat particulièrement approprié à l'utilisation de la thérapie génique. Cependant, cette stratégie se heurte encore à quelques

limitations, dont l'immunogénicité des vecteurs viraux, le coût et la difficulté de régulation des niveaux protéiques<sup>124</sup>.

En parallèle, la synthèse d'ARNm transcrits *in vitro* (*In vitro* Transcribed mRNA - IVT mRNA) est relativement simple, peu coûteuse et le contrôle des processus de production, nécessaire à une application clinique, est aisé. Brièvement, ces ARNm sont synthétisés à partir d'une séquence ADN par biologie moléculaire (utilisation d'enzymes ou modifications chimiques), dans des systèmes totalement dépourvus de cellules. Cela représente un avantage, notamment pour l'uniformisation de la production mais également concernant les risques infectieux, la présence d'impuretés issues des cellules ou des milieux de culture, comparé à la production de protéines recombinantes. De plus, la protéine synthétisée *in vivo* est autologue et subit les modifications post-traductionnelles (notamment les glycosylations) de manière endogène.

Enfin, les ARNm sont largement utilisés comme outil thérapeutique, que ce soit pour reprogrammer des cellules en cellules souches pluripotentes (induced pluripotent stem cells - iPSC), pour transfecter des cellules utilisées en thérapie cellulaire, ou pour une transfection directe de l'ARNm afin d'induire une production protéique endogène<sup>390</sup>. Ainsi, on retrouve des stratégies thérapeutiques utilisant les ARNm en oncologie, dans le traitement de maladies infectieuses, en cardiologie, en endocrinologie ou encore dans des protocoles de vaccination<sup>391</sup>.

Une fois toutes ces considérations prises en compte, l'utilisation des IVT mRNA comme alternative à la thérapie de substitution m'a paru une possibilité intéressante. Pour étudier cela, j'ai utilisé des IVT mRNA codant des FVIII BDD, modifiés et purifiés pour améliorer leur stabilité, leur taux de traduction et diminuer leur immunogénicité<sup>357</sup>. Ainsi, la partie codante a été optimisée et la coiffe en 5' modifiée pour un meilleur taux de traduction, la queue poly-A de 100nt et les parties non-codantes (5'-UTR et 3'-UTR) ont été conçues pour améliorer la stabilité des ARNm et, enfin, certains nucléosides ont été remplacés pour limiter au maximum l'activation de l'immunité innée<sup>356,392,393</sup>.

La première étape a été de valider que dans un système relativement simple, *in vitro*, les ARNm permettaient une production et une sécrétion de FVIII actif. En effet, d'une part le

FVIII est une protéine avec un faible taux de traduction mais d'autre part, il doit également être sécrété pour exercer son activité pro-coagulante sur le site de saignement. La détection de FVIII dans le surnageant de culture m'a permis de valider la production de FVIII et également de vérifier que la séquence signal de sécrétion, présente dans la séquence ADN, permettait la sécrétion de la protéine. Cependant, je n'ai pas quantifié la proportion de FVIII sécrétée par rapport à la quantité de FVIII produite par la cellule, ce qui, nous le verrons dans les paragraphes suivants, pourrait expliquer une limite de ce projet. Suite à cette validation, j'ai étudié la production de FVIII endogène par un modèle murin déficient en FVIII.

Le premier facteur que j'ai pris en compte est la voie d'injection. En effet, une limite de cette technologie est l'absence de ciblage des cellules qui internalisent l'ARNm et produisent la protéine. Dans le cadre du FVIII, les cellules qui le produisent sont primordiales. Comme décrit dans le paragraphe « Synthèse du FVIII », le FVIII doit être clivé par des protéases intracellulaires pour être mature, ce qui peut constituer une difficulté supplémentaire. S'il a été montré que le FVIII est produit par les cellules endothéliales sinusoidales dans le foie et dans d'autres organes, j'ai souhaité cibler le foie. En effet, le foie est relativement facile à atteindre puisque la présence de capillaires fenestrés (assez perméables) dans cet organe permet une transfection des cellules adjacentes aux vaisseaux, suite à l'injection dans la circulation sanguine. Une diffusion paracrine permet ensuite une transfection des autres cellules hépatiques, plus éloignées des vaisseaux<sup>391</sup>. J'ai donc choisi d'injecter les souris par voie intraveineuse et j'ai détecté, entre 6h et 72 après l'injection, une forte production de FVIII endogène actif.

J'ai ensuite été confronté à une difficulté qui est la l'identification des cellules produisant le FVIII. Les techniques d'imagerie en notre possession ne me permettent pas de détecter les faibles quantités de FVIII produites et de déterminer précisément par quelles cellules il est produit. Par ailleurs, selon notre collaboratrice spécialiste des IVT mRNA, des techniques de RT-PCR ne m'auraient pas permis de détecter par quelles cellules nos ARNm étaient internalisés. D'après elle, l'ARNm a la possibilité de se coller à la matrice extracellulaire et sa détection dans un organe n'aurait pas permis de conclure à l'internalisation de l'ARNm par un type cellulaire précis (Karikó, mail du 07/03/2017). J'ai donc validé la production protéique après injection intraveineuse en utilisant des

ARNm codant pour la luciférase, beaucoup plus simple à détecter. J'ai ainsi détecté une production splénique de la luciférase. J'ai également confirmé l'accumulation de FVIII endogène dans la zone marginale de la rate, comme précédemment décrit après injection de FVIII thérapeutique<sup>223</sup>.

Enfin, j'ai souhaité valider qu'une unique injection d'ARNm permettait la correction des saignements. Une expérience de « tail clipping » a donc été mise en place, où le bout de la queue des souris est sectionné et le volume de sang perdu en 20 minutes est évalué. J'ai ainsi pu démontrer que 24h après l'injection d'ARNm, les souris injectées coagulent autant que des souris injectées avec du FVIII thérapeutique. J'ai ainsi comparé avec des souris traitées avec de fortes doses de FVIII (3 UI/souris correspondent approximativement à 150 UI/kg), ou de plus faibles doses (60 UI/kg). Cette correction du phénotype hémorragique me permet de confirmer que cette technologie utilisant des ARNm codant le FVIII est une potentielle alternative crédible à la thérapie de substitution. Par ailleurs, j'ai déterminé une demi-vie de présence du FVIII de presque 18h, laissant espérer une nette diminution de la fréquence d'injection nécessaire à une présence continue de FVIII.

Tout comme ce qui est fait dans le cas de la thérapie génique, après avoir validé la production de FVIII endogène, j'ai souhaité évaluer la toxicité de cette nouvelle stratégie thérapeutique. En effet, j'avais émis l'hypothèse que le FVIII endogène serait moins immunogène que le FVIII thérapeutique, mais je n'avais que très peu d'indications sur l'immunogénicité des ARNm. Et effectivement, bien que le FVIII soit produit de manière endogène, j'ai constaté une très importante réponse immunitaire anti-FVIII. J'ai détecté l'apparition d'IgG anti-FVIII inhibiteurs dès la deuxième injection d'ARNm chez la souris. Dans le cas du FVIII recombinant, cette réponse est apparue plus tard et le plateau des titres inhibiteurs atteint était 10 à 20 fois plus faible que dans le cas de l'ARNm. Plusieurs éléments peuvent expliquer cette réponse et doivent être étudiés.

Le premier d'entre eux est la forte production, soudaine, de FVIII endogène. En effet, une seule injection de 3 ou 5 µg d'ARNm permet d'atteindre 40% de l'activité FVIII trouvée dans un plasma normal, 24h après l'injection. Si cette production permet une correction totale du phénotype hémorragique, il a été démontré que la quantité de FVIII produit par

chaque cellule est cruciale. En effet, dans le cadre d'études de thérapie génique, où la quantité de vecteur par cellule est une variable étudiée, il a été démontré que si une seule cellule internalise trop de vecteur, le FVIII s'accumule dans le réticulum endoplasmique et cause un stress cellulaire<sup>394</sup>. Cette accumulation de protéines mal repliées déclenche une réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui peut engendrer l'apoptose cellulaire<sup>395</sup>. Or, nous l'avons vu dans l'introduction, les cellules qui entrent en apoptose peuvent être source de signaux de danger. Si j'ai choisi de mener notre étude avec 3 µg d'ARNm, dose la plus faible permettant de rester au-dessus des 5% d'activité FVIII à 72h, il faut envisager la possibilité de diminuer cette dose afin de trouver un équilibre entre l'efficacité de correction de la coagulation et le déclenchement du stress endoplasmique. Pour cela, la quantification de FVIII intracellulaire *in vitro* me permettrait d'évaluer la quantité de FVIII sécrétée par rapport à la quantité de FVIII produit et ainsi d'évaluer l'accumulation possible de FVIII dans la cellule. De plus, une étude précise de l'activation de la protéine BiP (Binding Immunoglobulin Protein), marqueur de stress endoplasmique, en fonction de la dose d'ARNm injectée pourrait être menée.

Le deuxième élément qui pourrait expliquer le déclenchement d'une telle réponse immunitaire est l'ARNm en lui-même. En effet, si aucune étude ne montre l'apparition d'une réponse humorale dirigée contre les ARN (anticorps anti-ARN) dans le cadre d'injection d'ARNm exogène, les ARN peuvent activer l'immunité innée, notamment lorsqu'ils sont reconnus par les TLR 3, 7 ou 8<sup>396-398</sup>. Cela a pour conséquence la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire propice, nous l'avons vu, au développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII.

Si cette propriété d'adjuvant est un atout dans un contexte vaccinal, elle est délétère lorsque l'ARNm est utilisé dans le cadre d'un traitement de substitution. Le remplacement des uridines par des pseudo-uridines (1-méthylpseudouridine) permet d'inhiber la reconnaissance de l'ARNm par les TLR 7 et 8 et prévient la production de TNF $\alpha$  par des DC après incubation avec des ARNm<sup>356,399</sup>. De plus, la purification des IVT mRNA par chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) permet d'éviter la présence d'ARNm double brins, reconnus par le TLR 3<sup>357</sup>. Dans cette étude, pour complexer l'ARNm, j'ai utilisé le TransIT mRNA Transfection Kit® qui forme des particules d'environ 100 nm. Une étude *in vitro* a montré que l'orientation de

la réponse immunitaire est dépendante de la taille des particules<sup>400</sup>. Lorsque des PBMC sont incubés avec des nanoparticules, ces particules sont phagocytées par des DC plasmacytoïdes qui produisent de l'INF $\alpha$ , tandis que les microparticules sont, elles, reconnues par des monocytes qui produisent du TNF $\alpha$ . Ainsi, il serait intéressant de transférer des PBMC avec notre ARN complexé dans le TransIT et de doser la production d'INF $\alpha$  afin de valider l'innocuité du complexe. L'utilisation d'autres agents pour complexer l'ARNm codant le FVIII pourrait être un levier pour réduire l'immunogénicité de cette approche. Les agents de transfection sont un ensemble de molécules qui encapsulent l'ARNm. Lorsqu'ils sont non-viraux, ils peuvent être constitués d'un mélange de lipides ou de protéines et présentent chacun des caractéristiques qui leur sont propres<sup>401</sup>. Ainsi, selon le type de lipide ou de polymère choisi, la taille, la capacité ou la charge du complexe seront différentes et les propriétés de transfection, de dégradation ou d'immunogénicité varieront également<sup>402,403</sup>. La nature des agents de transfection utilisés joue donc un rôle primordial dans l'efficacité de la stratégie ARNm. Tout d'abord, ils permettent de protéger les ARNm de la dégradation par les RNAses, très présentes dans le milieu extracellulaire. En effet, en conditions physiologiques, l'ARNm n'est retrouvé qu'en intracellulaire et la détection d'ARNm hors de la cellule peut constituer un signal de danger pour l'organisme<sup>404</sup>. Par ailleurs, les agents de transfection facilitent l'internalisation de l'ARNm puisque naturellement les ARNm rejoignent le cytoplasme en sortant du noyau et non pas en franchissant la membrane plasmique. Dans notre cas la difficulté ne semble pas provenir d'un défaut de transfection, mais pourrait plutôt provenir d'une production extra-hépatique du FVIII. En effet, dans le cas du FVIII, le seul signal détecté l'était dans la rate, bien que nous ne puissions pas déterminer s'il s'agit du lieu de production du FVIII transgénique ou de son accumulation après production/sécrétion dans un autre organe. Le foie est un organe considéré comme ayant une capacité d'induction de tolérance<sup>405</sup>, raison pour laquelle les études de thérapie génique ciblent essentiellement cet organe. Les raisons évoquées pour expliquer cette tolérogénicité sont notamment la production de cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$  et IL-10) par certaines cellules du foie, ainsi que l'expression de molécules immunosuppressives (PD-L1 et CTLA-4) inhibant l'activation des LT ou encore la génération de Treg<sup>406</sup>. Pardi et al. ont fait une analyse précise des organes ciblés selon la voie d'injection de l'ARNm chez la souris et ont confirmé la prévalence hépatique chez les souris injectées par voie intraveineuse<sup>407</sup>.



Malheureusement, je n'ai pas réussi à reproduire ces résultats et l'utilisation d'un moyen de ciblage plus précis semble essentielle dans notre modèle. Or, les agents de transfection pourraient me permettre d'améliorer la spécificité de distribution de l'ARNm. Une étude systématique de la composition des nanoparticules lipidiques (LNP) a permis d'optimiser leur composition afin d'améliorer, *in vivo*, leur capacité à transfecter des hépatocytes<sup>408</sup>. Ainsi, la modification de la constante de dissociation acide (pKa) de certains lipides en périphérie du complexe permet une modification de la charge globale, propice à la transfection d'hépatocytes. De plus, les molécules de surface ASGR2 (récepteur aux asialoglycoprotéines 2) et TFR2 (Transferrin receptor protein 2) ont été identifiées comme des marqueurs spécifiques des hépatocytes par deux stratégies différentes<sup>409</sup>. L'étude des molécules membranaires est intéressante pour le ciblage par les LNP car récemment, une nouvelle stratégie a par exemple montré la possibilité d'inhiber la réponse immunitaire en couplant des LNP contenant des siRNA avec un anticorps dirigé contre un antigène spécifique de populations de DC (DEC205) : ces LNP ciblent les DC exprimant DEC205, qui sont transfectées avec les siRNA dirigés contre CD40, CD80 et CD86, ce qui inhibe l'activation de la réponse immunitaire<sup>359</sup>. Nous avons vu au paragraphe « Description du FVIII » que les cellules endothéliales de la microvasculature sont également capables de synthétiser du FVIII<sup>32</sup>. Pour tenter de cumuler l'aspect tolérogène du foie avec la capacité naturelle de ces cellules à produire du FVIII, il serait intéressant de les cibler dans le foie. Chez la souris, les cellules endothéliales sinusoidales ont été caractérisées telles que VEGFR3<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>, VE-cadherin<sup>+</sup>, Factor VIII<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>. Si aucune de ces molécules n'est spécifique de cette population cellulaire, il est à noter que l'expression de VEGFR2 et 3 est exclusivement restreinte aux cellules endothéliales hépatiques et n'est retrouvée sur aucune autre cellule du foie<sup>410</sup>. Il serait alors intéressant de formuler nos ARNm dans des LNP avec un tropisme hépatique, qui pourraient être couplés avec des anticorps anti-VEGFR 1 et 2 pour obtenir une production préférentiellement par les cellules endothéliales hépatiques. Il pourrait en résulter une production hépatique du FVIII beaucoup moins immunogène qu'actuellement.

Enfin, une troisième possibilité existe si ni le stress cellulaire, ni l'ARNm, ni l'agent de transfection ne sont responsables du déclenchement de la réponse immunitaire. Il est possible que, comme dans le cas du FVIII thérapeutique, le FVIII transgénique produit de

manière endogène soit endocyté par les CPA et que ses peptides soient présentés aux LT. Une solution qui pourrait nous permettre de contrôler la réponse anti-FVIII serait alors l'utilisation de FVIII moins immunogène. Nous avons vu dans l'introduction que l'immunogénicité du FVIII pouvait être modulée en empêchant son endocytose par les CPA, notamment en mutant des résidus chargés dans les domaines C1 ou C2<sup>160,404</sup>. Ainsi, l'utilisation d'un ARNm codant le FVIII triple muté (R2090A/K2092A/F2093A) pourrait être envisagée<sup>162</sup>. De plus, un FVIII développé par le Dr Lenting possédant une affinité accrue pour le vWF et ne montrant pas d'immunogénicité<sup>235</sup> serait une solution idéale pour l'optimisation de notre stratégie.

Dans l'hypothèse où le contrôle de l'immunogénicité serait efficace, ce projet ouvrirait alors la voie à l'amélioration de nombreuses stratégies existantes. Tout d'abord, il serait possible d'utiliser des ARNm codant pour des FVIII à demi-vie prolongée (FVIII-Fc...) et ainsi obtenir une présence de FVIII dans le plasma encore plus longue. Puisque de forts taux de FVIII sont atteints pendant plusieurs jours avec une unique injection d'ARNm, il serait également intéressant d'étudier la possibilité d'utilisation des IVT mRNA dans des protocoles d'ITI. Cette technologie pourrait par exemple permettre de réduire la fréquence d'injection des patients dans des protocoles à fortes doses de FVIII.

## **II. Prévention de la réponse mémoire anti-FVIII par inhibition de la 'Bruton's Tyrosine Kinase' (Btk) chez la souris déficiente en FVIII**

Le deuxième projet auquel j'ai participé pendant ma thèse concerne justement l'immunogénicité du FVIII thérapeutique. La complication la plus courante chez les patients traités avec du FVIII exogène est l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre ce FVIII et conduisant à l'apparition d'anticorps inhibiteurs. Durant cette réponse immunitaire, le FVIII est reconnu par des cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui appréhendent le FVIII et présentent des peptides via leur CMH II. Ce complexe CMH/peptide est reconnu par le TCR d'un LT naïf spécifique du FVIII qui s'active et active à son tour un LB naïf via son BCR. Le LB se différencie alors soit en plasmocytes qui synthétisent les IgG

anti-FVIII, soit en LB mémoires. Les plasmocytes sont divisés entre deux populations, les plasmocytes à courte durée de vie qui restent dans les organes lymphoïdes secondaires et les plasmocytes à longue durée de vie qui migrent dans des niches de la moelle osseuse. Lors d'une seconde rencontre avec le FVIII, celui-ci est reconnu par le BCR de forte affinité exprimé par les LB mémoires qui, d'une part se différencient directement en plasmocytes synthétisant des anticorps de forte affinité pour le FVIII et, d'autre part, peuvent jouer le rôle de CPA et présenter à leur tour des peptides du FVIII.

Les LB sont donc une population cellulaire centrale dans la réponse immunitaire anti-FVIII et représentent donc une cible thérapeutique de choix pour éviter le développement d'une telle réponse ou pour inhiber une réponse en cours. De plus, le seul mécanisme décrit, au moins chez la souris, expliquant l'induction de tolérance au FVIII pendant des protocoles d'ITI est l'éradication des B mémoires par les fortes doses de FVIII<sup>299</sup>. Depuis, des stratégies pour cibler les LB ont été développées. L'utilisation d'un anticorps thérapeutique anti-CD20 (Rituximab) permet d'éradiquer les LB et de traiter certains patients ayant développé des inhibiteurs (cf. paragraphe « Description des protocoles d'ITI »). Cependant, les plasmocytes perdent l'expression du CD20 et ne sont donc pas atteints par cette thérapie. La possibilité d'utiliser le Bortezomib, un inhibiteur du protéasome qui est particulièrement actif dans les plasmocytes, a été évaluée au laboratoire il y a quelques années. Cet inhibiteur n'a cependant pas permis d'enrayer la production d'inhibiteurs après de multiples injections de FVIII<sup>321</sup>. Une autre stratégie a consisté à inhiber l'implantation des plasmocytes dans les niches de la moelle osseuse par utilisation d'un antagoniste du récepteur à la chimiokine CXCL12, essentielle à la migration de ces cellules<sup>411</sup>. Cependant, l'absence de spécificité antigénique de cette stratégie ne permet pas d'envisager une application clinique.

C'est pourquoi nous avons choisi, avec Sandrine Delignat qui a mené ce projet, de prévenir l'activation des LB spécifiques du FVIII par l'inhibition de la Bruton's Tyrosine Kinase (Btk), une kinase impliquée dans la voie de signalisation du BCR. La Btk, de par sa position juste en aval du BCR, permet le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires dès la liaison de l'Ag au BCR (cf. Figure 14). Elle permet notamment l'activation et la prolifération des LB et constitue donc une cible thérapeutique évidente. Des inhibiteurs de la Btk ont d'ailleurs été développés et l'un d'entre eux, l'ibrutinib (Imbruvica®), a reçu l'autorisation

de mise sur le marché dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), où il permet d'inhiber la survie et la prolifération des cellules B cancéreuses<sup>363</sup>. Cependant, il a été montré que l'ibrutinib peut également se fixer à l'Interleukin-2-inducible T-cell Kinase (Itk) exprimée par les LT<sup>374</sup>, pouvant laisser présager des effets secondaires. Ainsi, la société Pfizer a développé le PF-06250112, un inhibiteur de la Btk qui forme avec elle une liaison covalente via la cystéine 481, proche de la poche de fixation à l'ATP, empêchant ainsi l'autophosphorylation de la Btk. Le PF-06250112 ne présente pas de réaction croisée avec l'Itk et inhibe la Btk de façon réversible<sup>375</sup>.

Pour commencer, nous avons validé l'inhibition spécifique de la voie de signalisation du BCR par le PF-06250112 *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons traité des LB isolés, ou des souris déficientes en FVIII, avec l'inhibiteur de la Btk et avons stimulé, deux heures après, ces LB via leur BCR avec des fragments F(ab')<sub>2</sub>, ou de façon indépendante du BCR avec un anticorps anti-CD40. Nous avons alors constaté une inhibition dose-dépendante, par le PF-06250112, de l'activation des LB uniquement lors de la stimulation via leur BCR.

Nous avons ensuite étudié la possibilité de prévenir la réponse primaire anti-FVIII chez la souris déficiente en FVIII. Nous avons alors été confronté au fait que le gavage quotidien des souris hémophiles avec le PF-06250112 présentait un risque important d'induction d'hémorragies du tractus gastro-intestinal. Il fallait néanmoins couvrir toute la durée de présence du FVIII dans le sang (10 fois sa demi-vie) avec l'inhibiteur de la Btk. Sachant que ce dernier et le FVIII ont une demi-vie de 7h et 8h, respectivement, chez la souris, nous avons décidé de réaliser les gavages 24h avant l'injection de FVIII, le jour de l'injection puis les 3 jours suivants. Après quatre injections de FVIII, nous avons constaté une diminution des LT spléniques par rapport aux souris contrôles. Nous avons alors vérifié leur capacité à proliférer *in vitro* en réponse au FVIII et n'avons trouvé aucune altération. Ces résultats suggèrent que la diminution du nombre de LT spléniques est la conséquence de la diminution du nombre de LB folliculaires et de la zone marginale chez les souris traitées avec le PF-06250112. Il pourrait en découler une perturbation de l'homéostasie cellulaire dans la rate, expliquant la modification des populations de LT. Cette hypothèse est appuyée par une étude qui décrit, chez des souris dont les LB surexpriment la Btk, une augmentation du nombre de LT CD4<sup>+</sup> spléniques<sup>412</sup>. En revanche, il est relativement étonnant que nous n'ayons détecté aucune modification du nombre de

LB des centres germinatifs (CG). En effet, dans cette même étude, la surexpression de Btk entraîne une formation spontanée de CG. Par ailleurs, chez des souris déficientes en Btk (souris Xid), il a été décrit une architecture splénique modifiée, avec notamment l'absence de formation de CG, voire même la dissolution de CG déjà établis<sup>376</sup>. Ces observations sont cohérentes avec la diminution des populations de LB spléniques que nous avons constatée, mais devraient coïncider avec la diminution des LB des CG. Il serait intéressant d'étudier plus précisément la formation, par exemple par de l'immunofluorescence, de centres germinatifs dans notre modèle afin de déterminer si l'absence de modification dans le nombre de cellules correspond à une absence de centres germinatifs.

En revanche, la perturbation des populations spléniques par le PF-06250112 n'était pas corrélée avec une diminution des inhibiteurs anti-FVIII. Nous n'avons en effet constaté aucune différence significative entre les souris traitées par l'inhibiteur de la Btk et le groupe contrôle. Cette absence d'effet de l'inhibition de la Btk dans un contexte où le BCR a une faible affinité pour l'Ag a déjà été décrite<sup>376</sup>. En effet, l'étude de Benson et al. montre que la Btk est impliquée dans le cas d'Ag T-indépendants de type II, ou d'Ag T-dépendants, seulement si le BCR est de forte affinité pour ceux-ci. Malgré cette distinction selon l'affinité du BCR, il est plus probable qu'il faille plutôt distinguer les situations selon le rôle du LB. En effet, comme le montre la figure 14 (page 103), la Btk interagit avec le cytosquelette d'actine et permet notamment l'internalisation du BCR. Or, une étude montre que l'inhibition de la Btk diminue les mouvements intracellulaires et empêche le transport des vésicules contenant le BCR et l'Ag internalisé aux compartiments permettant son apprêtement<sup>413</sup>. Cette théorie pourrait expliquer que l'inhibition de la Btk ne soit efficace que dans le cas où le LB joue le rôle de CPA, en plus de reconnaître l'Ag via son BCR. Nous avons donc étudié l'effet du PF-06250112 dans le cadre d'une réponse mémoire anti-FVIII, situation dans laquelle les LB mémoires spécifiques du FVIII expriment vraisemblablement un BCR de forte affinité pour le FVIII et peuvent jouer le rôle de CPA. Nous avons donc immunisé des souris hémophiles contre le FVIII et attendu 90 jours, ce qui permet la disparition des plasmocytes à courte durée de vie<sup>414</sup>. Nous les avons ensuite traitées au PF-06250112 et au FVIII, selon le protocole précédemment décrit, pendant 2 semaines et avons dosé les IgG anti-FVIII. L'hétérogénéité des titres à J0 (avant traitement à l'inhibiteur) nous a contraint à calculer le ratio entre les titres à J7 et

J14 par rapport au titre initial pour chaque souris. Nous avons alors constaté que l'inhibition de la Btk permet une diminution significative de la réponse humorale anti-FVIII. Cependant, la production d'IgG anti-FVIII dans le groupe contrôle est la résultante de l'activation des B mémoires ainsi que de celle des plasmocytes à longue durée de vie présents dans la moelle osseuse. En effet, les plasmocytes perdent l'expression du BCR et l'ARNm codant la Btk y est diminué. Ainsi, l'inhibition de la Btk n'a pas d'effet sur ces cellules. Nous avons donc opté pour une stratégie de transfert adoptif au cours de laquelle des souris ont été immunisées contre le FVIII et leurs splénocytes récupérés. Nous les avons déplété en plasmocytes circulants (cellules exprimant CD138) et transféré à des souris hémophiles naïves. Ces souris ont ensuite été traitées avec le PF-06250112 et le FVIII pendant 2 semaines. Cette expérience nous a permis de confirmer les résultats, à savoir que les souris ayant reçu des splénocytes déplétés en cellules CD138<sup>+</sup> et traitées avec l'inhibiteur de la Btk ne développent pas d'IgG anti-FVIII alors que le groupe contrôle en développe après deux injections de FVIII. Enfin, nous avons montré que l'effet du PF-06250112 inhibe *in vitro* la différenciation des LB mémoires en plasmocytes.

Ainsi, à travers cette étude, nous avons montré que l'inhibition de la Btk permet l'inhibition de la différenciation des LB mémoires en plasmocytes et permet ainsi la diminution de la génération d'anticorps anti-FVIII. Cette stratégie pourrait constituer un outil supplémentaire pour traiter des patients avec inhibiteurs. Le fait que cet inhibiteur soit réversible, contrairement à l'ibrutinib, peut constituer un avantage. En effet, dans un essai clinique de phase III, il a été rapporté des effets secondaires après traitement à l'ibrutinib. Une lymphocytose est trouvée chez 20% des patients et des troubles de l'hémostase chez 18 à 44% d'entre eux<sup>370</sup>. Si une inhibition réversible peut laisser espérer une diminution des effets secondaires lors d'un traitement chronique, l'apparition d'effets secondaires devra également être étudiée après traitement au PF-06250112. Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que l'ibrutinib, approuvé dans le traitement de lymphomes du manteau, a un effet antagoniste à celui du Rituximab, couramment utilisé dans le traitement des lymphomes<sup>415</sup>. En effet, l'ibrutinib empêche la stimulation des cellules Natural Killer (NK) par la liaison du fragment Fc du Rituximab au récepteur Fc. Cela a pour conséquence l'absence de dégranulation des cellules Natural Killer. Cette incompatibilité des traitements pourrait constituer une limite à l'utilisation de l'ibrutinib et augmenter le

besoin d'autres inhibiteurs de la Btk. Cependant, une limite principale de ce traitement, quel que soit l'inhibiteur utilisé, consiste en sa spécificité. En effet, la Btk n'est activée qu'en cas de liaison de l'Ag au BCR. Ainsi, son inhibition ciblera uniquement les LB activés, mais quel que soit l'antigène qui l'active. C'est la raison pour laquelle l'inhibiteur de la Btk doit être introduit uniquement quand le FVIII est présent, pour éviter qu'il inhibe les LB activés par d'autres antigènes au cours du temps. Là encore, la réversibilité du PF-06250112 peut constituer un avantage. De plus, pour palier à cette absence de spécificité, il serait intéressant d'étudier la possibilité de cibler des LB spécifiques du FVIII avec l'inhibiteur de la Btk. Pour inhiber uniquement les LB spécifiques du FVIII, Macauley et al. ont utilisé des nanoparticules avec du FVIII à leur surface. En plus du FVIII, ces nanoparticules portent le CD22L, qui, lorsqu'il rencontre son récepteur, le CD22, engendre l'apoptose de la cellule<sup>416</sup>. Il serait intéressant d'étudier la possibilité d'encapsuler le PF-06250112 dans des nanoparticules portant du FVIII afin d'inhiber uniquement ces LB.

Une seconde limite de cette molécule est l'incapacité à cibler les plasmocytes à longue durée de vie. En effet, si le PF-06250112 n'inhibe pas les LB lors d'une réponse primaire, on peut imaginer qu'il n'empêche pas leur différenciation en plasmocytes à longue durée de vie. Ainsi, lors d'une réponse mémoire, bien qu'il empêche la formation de nouveaux plasmocytes, ceux déjà nichés dans la moelle osseuse synthétiseront des inhibiteurs, jusqu'à épuisement de tous les plasmocytes. On peut donc penser que l'inhibition de la Btk ne permettra pas une diminution des titres inhibiteurs dès la première réponse mémoire, mais qu'il faudra attendre l'épuisement de tous les plasmocytes à longue durée de vie. L'utilisation du bortezomib en combinaison avec l'inhibiteur de Btk pourrait être intéressante. En effet, si le bortezomib ne permet pas d'inhiber les plasmocytes nichés dans la moelle osseuse, il permet d'éviter leur formation lorsqu'il est co-injecté avec le FVIII<sup>321</sup>. On peut imaginer un traitement au PF-06250112 et au bortezomib lors de la première injection de FVIII. Il y aurait alors uniquement génération de LB mémoires, mais pas de plasmocytes. Lors des injections futures de FVIII avec l'inhibiteur de la Btk, les LB mémoires prendraient en charge le FVIII mais seraient ciblés par l'inhibition de la Btk.

En plus de fournir un nouvel outil prometteur pour contrôler les titres d'IgG anti-FVIII chez les patients avec inhibiteurs, ce projet ouvre la voie à de nouvelles thérapies combinées lorsque la différenciation des LB mémoires en plasmocytes doit être inhibée.

### **III. Caractérisation d'un nouveau modèle murin déficient en FVIII et humanisé pour le HLA-DRB1\*01:01**

Le développement d'outils pour contrecarrer la réponse immunitaire anti-FVIII, tels que le PF-06250112, est grandement dépendant du modèle utilisé. Ainsi, les modèles murins utilisés sont centraux dans l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII. Si les modèles utilisés à l'heure actuelle sont de très bons substituts pour étudier la polarisation des cellules immunitaires ou la phase humorale de la réponse, une limite existe quant à la présentation du FVIII par les CPA. En effet, les cellules murines expriment un CMH II murin qui, une fois le FVIII apprêté, présentent les peptides pour lesquels ils ont la meilleure affinité. Or, chez le patient, les CMH humains n'ont probablement pas la même affinité pour les différents peptides du FVIII et ne présentent donc probablement le même répertoire de peptides du FVIII. Ainsi, l'étude des variations de ce répertoire en fonction de l'haplotype HLA-DR est impossible dans un modèle murin et la validation *in vivo* de FVIII dont les épitopes seraient mutés non plus. C'est la raison pour laquelle il y a quelques années, un modèle murin déficient en FVIII et humanisé pour le CMH II a été développé<sup>389</sup>. Ces souris expriment l'allèle DRB1\*15:01 qui avait été identifié comme un facteur de risque vis-à-vis de l'apparition d'inhibiteurs<sup>143</sup>. Ce modèle a été caractérisé et a permis l'analyse *in vivo* du répertoire des peptides présentés par cet haplotype CMH II et la génération d'hybridomes de LT spécifiques de ces peptides. Si l'allèle DRB1\*01:01 n'est pas un facteur de risque pour l'apparition d'inhibiteurs, il est malgré tout un allèle fréquent dans la population caucasienne et est retrouvé chez 10% des patients hémophiles A<sup>144</sup>.

Nous avons donc généré un modèle de souris déficientes en FVIII, pour les CMH I et II murins et transgéniques pour les CHM I et II humains (HLA-A2.1 et HLA-DRB1\*01:01,



respectivement). J'ai caractérisé ce modèle en commençant par étudier les anticorps sériques et les populations cellulaires spléniques des souris naïves. J'ai observé des titres d'IgM totaux significativement augmentés chez les souris transgéniques par rapport aux souris exprimant les CMH murins. En revanche, les titres d'IgG totales sont eux, plus de 10 fois inférieurs. Cette répartition différente des isotypes est corrélée avec une augmentation de la population de LB spléniques, due à l'augmentation du nombre de LB folliculaires. Une diminution du nombre de LT CD8<sup>+</sup> chez les souris transgéniques a également été constatée. Les populations de CPA (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) sont, elles, identiques dans les deux lignées. J'ai alors étudié la capacité des LT à proliférer et n'ai constaté aucune différence entre les souris transgéniques et les souris hémophiles.

Sachant que les populations de LB transitionnels et de la zone marginale sont identiques entre les deux lignées et que les LT semblent fonctionnels, il serait intéressant d'étudier la cause de l'augmentation du nombre de LB folliculaires. En effet, cette augmentation peut-elle traduire une incapacité à former des centres germinatifs ? Les LB folliculaires participent à la formation des centres germinatifs où ils subissent les processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique. Dans le cas d'un défaut de formation des centres germinatifs, on peut penser que ces LB folliculaires s'accumulent dans la rate car ils ne se différencient pas. De plus, n'ayant pas subi la commutation isotypique, ils synthétisent principalement des IgM et peu d'IgG de faible avidité de manière indépendante de l'antigène. Cette hypothèse est supportée par l'étude du syndrome d'hyper IgM (HIGM) dont la mutation des gènes codant les molécules de co-stimulation CD40 et CD40L sont une des causes. En effet, chez la souris déficiente en CD40, la communication altérée entre LT et LB résulte en un nombre augmenté de follicules B, en une population de LT CD4<sup>+</sup> intra-folliculaires inchangée et en une absence de formation de centres germinatifs<sup>417,418</sup>. En revanche, chez les patients chez qui l'HIGM est causé par une déficience en AID (rôle décrit dans le paragraphe « Rôle des lymphocytes B »), on constate l'apparition de centres germinatifs géants<sup>419,420</sup>. L'étude de ce symptôme montre bien qu'une altération de la communication entre les LT et LB peut mener à des symptômes proches de ceux décrits dans cette lignée transgénique. Dans notre cas, la modification du CMH peut laisser penser que la situation est plus proche de celle décrite

suite à une déficience en CD40 ou CD40L qu'en AID. On peut donc imaginer qu'en étudiant la formation des centres germinatifs, on pourrait constater leur diminution, voire leur disparition chez les souris transgéniques.

La seconde partie de l'étude a consisté en l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII chez ces souris. J'ai quantifié les inhibiteurs anti-FVIII chez des souris immunisées et confirmé la prévalence des IgM anti-FVIII chez les souris transgéniques ainsi que la diminution des IgG anti-FVIII, par rapport aux souris déficientes en FVIII. J'ai injecté les souris à sept reprises avec du FVIII et étudié la capacité des splénocytes à proliférer *ex vivo*. Je n'ai constaté aucune différence entre les deux lignées dans la capacité des splénocytes à proliférer en réponse au FVIII. Il est à noter ici que lorsque les splénocytes ont été stimulés avec la concanavaline A, un mitogène non spécifique, j'ai constaté une différence significative entre les deux lignées lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse. Cette différence n'est en revanche, pas retrouvée lorsque les souris sont injectées par voie sous-cutanée. L'utilisation de la concanavaline A dans cette expérience nous permet de définir si une différence de prolifération est spécifique d'un antigène (ici par exemple, spécifique du FVIII) ou si elle résulte d'une différence intrinsèque des LT spléniques à proliférer. En effet, si la prolifération en réponse à la concanavaline A est identique chez tous les groupes, mais qu'elle diffère après stimulation avec le FVIII, alors on peut conclure que ce sont les LT spécifiques du FVIII qui sont concernés. Dans notre cas, la différence est observée en réponse à la concanavaline A, mais pas au FVIII et uniquement après injection intraveineuse de FVIII. Cela voudrait dire que les splénocytes ont globalement une altération de leur capacité à proliférer, sauf au FVIII. Bien que le nombre de souris par groupe soit déjà important ( $n > 10$ ), il serait intéressant de reproduire cette expérience. En effet, il semble étrange qu'un antigène modifie la capacité intrinsèque des LT à proliférer, mais pas leur capacité à proliférer en réponse à ce même antigène. J'ai ensuite étudié l'expression du CMH II transgénique par les LB et les cellules dendritiques par cytométrie en flux. Si j'ai bien confirmé la disparition de l'expression du CMH II murin chez les souris transgéniques, il a en revanche été impossible de détecter la présence du HLA-DRB\*01:01.

L'absence d'expression membranaire du CMH II semble confirmer l'hypothèse d'une communication altérée entre les LT et les cellules censées exprimer le CMH transgénique. On peut donc supposer que lors de la réponse immunitaire anti-FVIII, la communication

entre toutes les CPA (CD, macrophages, mais aussi LB mémoires) et les LT est altérée. Cependant, cela est remis en cause par le fait que ces mêmes cellules soient capables de faire proliférer les LT dans un test *ex vivo*, alors qu'*in vivo*, la réponse immunitaire est altérée. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence entre l'*in vitro* et l'*in vivo*. D'une part, le test *ex vivo* quantifie la prolifération des splénocytes par incorporation de thymidine tritiée. Si cela permet de quantifier la division cellulaire, il se peut que dans un certain contexte, cela ne reflète pas leur activation fonctionnelle. L'incorporation de thymidine ne traduirait alors pas d'une capacité à activer des LB. D'autre part, on pourrait envisager une activation normale des LT *in vivo* qui activeraient les LB, mais que ces derniers soient incapables de répondre à la stimulation. Sachant que la présence du gène codant les CMH humains a été validée par PCR, il est primordial de savoir si l'absence de CMH à la surface des cellules est liée à un problème de production de la molécule ou d'expression. Pour cela, la présence des ARNm codant pour les CMH transgéniques sera effectuée. Si l'ARNm est retrouvé dans les cellules, la détection de la molécule de CMH en intracellulaire sera essentielle. Il a été montré que l'expression du CMH II peut être augmentée par l'ajout d'interféron gamma (IFN $\gamma$ )<sup>421,422</sup>. En effet, l'IFN $\gamma$  induit l'expression de la protéine CIITA (Class II Transactivator) qui induit la transcription du gène codant le CMH de classe II<sup>423</sup>. Ainsi, dans le cas d'un défaut de transcription du gène, l'apport d'IFN $\gamma$  ou de CIITA pourrait permettre une expression du CMH II. De plus, la détection du CMH I transgénique pourrait être envisagée afin de déterminer si cette déficience est spécifique du CMH II ou pas.

Si l'absence d'expression du CMH II est très décevante, notamment à la vue des 24 mois nécessaires à Sandrine Delignat pour obtenir cette nouvelle lignée murine, la caractérisation de ce modèle n'en reste pas moins très intéressante. Avant de pouvoir être utilisé comme un outil et fournir des informations sur le répertoire de peptides présenté par l'allèle DRB1\*01:01, ce modèle murin nous permet d'étudier l'importance de l'activation des LB dans la réponse immunitaire anti-FVIII. A terme, nous espérons pouvoir identifier des épitopes T du FVIII afin de les modifier et de générer un FVIII moins immunogène.

# **CONCLUSION & PERSPECTIVES**

La thérapie de substitution est à l'heure actuelle le traitement privilégié pour prévenir ou traiter les saignements chez les patients atteints d'hémophilie A. Ce traitement consiste en l'injection de FVIII exogène. Ce FVIII thérapeutique est soit purifié à partir du plasma de donneurs sains, soit produit par génie génétique. Qu'il soit dérivé de plasma ou recombinant, sa production est compliquée et coûteuse et sa demi-vie n'excède pas 12 heures. Ainsi, les patients sont contraints à des injections fréquentes, ce qui altère leur qualité de vie. De nouvelles stratégies alternatives à la thérapie de substitution ont donc été développées. Certaines visent à modifier le FVIII pour en augmenter sa demi-vie, notamment par l'ajout de fragment Fc ou par sa PEGylation. Cependant, l'augmentation de la demi-vie du FVIII est limitée par la demi-vie de sa protéine chaperonne, le facteur Willebrand (vWF). D'autres stratégies se sont intéressées à la possibilité d'utilisation d'agents court-circuitant le FVIII dans la cascade de la coagulation. Ainsi, l'utilisation de facteur VII activé (FVIIa), de concentrés de protéines du complexe prothrombinique activé - aPCC ou encore l'utilisation d'inhibiteurs des régulateurs naturels de cette cascade (aPC, le TFPI, ou l'antithrombine) ont vu le jour. Une nouvelle stratégie a quant à elle proposé l'utilisation d'un anticorps bi-spécifique, reconnaissant d'une part le facteur IX activé (FIXa) et le facteur X (FX) et permettant leur rapprochement spatial. Cette molécule, l'Hemlibra® joue donc le rôle du FVIII et permet l'activation du FX. Enfin, la thérapie génique offre une possibilité de traitement très intéressante aux patients. Cependant, elle est encore confrontée à certaines limites et notamment à la préexistence chez une large proportion de la population, d'anticorps anti-adenovirus associated vector (AAV), qui sont les vecteurs majoritairement utilisés en thérapie génique. De plus, la nécessité d'insertion dans le génome représente encore une difficulté au succès de cette thérapie.

L'objectif de la première partie de mon projet de thèse a donc été de proposer et de valider une nouvelle stratégie alternative à la thérapie de substitution. Cette stratégie repose sur l'utilisation d'ARNm transcrits *in vitro* (IVT mRNA) codant pour le FVIII. Les ARNm permettent une production continue de la protéine pendant leur présence dans la cellule et, contrairement à la thérapie génique, les ARNm n'ont pas à s'intégrer dans le génome. De plus, leur expression est régulée par des mécanismes physiologiques, facilitant leur application en thérapeutique. La preuve de concept pour l'utilisation d'ARNm dans le

cadre d'une thérapie de substitution a été apportée dans le cas de l'érythropoïétine (EPO)<sup>331</sup>. L'injection de 0,1 µg d'ARNm codant l'EPO à des souris ou des singes permettait une augmentation de l'hématocrite, ainsi qu'une présence dans le plasma cinq fois plus longue qu'après administration de 3 µg de protéine. J'ai ainsi montré que l'utilisation d'ARNm formulé dans des nanoparticules lipidiques permet la production *in vitro* et *in vivo* de FVIII endogène. De plus, une injection d'ARNm codant le FVIII à des souris déficientes en FVIII permet la restauration de 40% de l'activité FVIII en 24h et permet une détection de FVIII dans le plasma pendant 72h. La quantité de FVIII produite pendant ces 72h est équivalente à 6 fois la quantité de FVIII thérapeutique injectée lors de la thérapie de substitution. Par immunofluorescence, j'ai également observé l'accumulation du FVIII endogène dans la zone marginale de la rate à proximité des macrophages métallophiliques, confirmant des résultats obtenus avec du FVIII thérapeutique<sup>223</sup>. Enfin, j'ai démontré qu'une unique injection d'ARNm permet la correction du phénotype hémorragique dans des expériences de « tail clipping ». Cependant, lorsque j'ai évalué la toxicité de cette stratégie lors d'injections répétées, j'ai constaté une très forte réponse immunitaire, avec une apparition précoce et amplifiée d'inhibiteurs comparé aux souris injectées avec du FVIII recombinant. Il est possible que cette forte immunogénicité soit due à la production de signaux de danger qui peuvent provenir de plusieurs sources. La première d'entre elles pourrait être des cellules qui entrent en apoptose. En effet, il a été montré qu'une accumulation protéique dans le réticulum endoplasmique peut provoquer un stress cellulaire conduisant à l'apoptose de la cellule<sup>395</sup>. Or, cette apoptose peut être source de signaux de danger (cf. Figure 8) et promouvoir le déclenchement de la réponse anti-FVIII. Par ailleurs, les ARNm ont une propriété d'adjuvant, très utile dans un contexte vaccinal. En revanche, lorsqu'ils sont utilisés pour un traitement de substitution, cette propriété devient délétère. Les ARNm sont en effet capables d'activer l'immunité innée via les Toll Like Receptors (TLR), bien que les modifications apportées aux IVT mRNA abrogent cette reconnaissance<sup>356</sup>. Les nanoparticules lipidiques dans lesquelles sont formulés les ARNm pourraient, elles, constituer une source de signaux de danger<sup>402</sup>. De plus, l'utilisation de différents agents de transfection permettrait une optimisation de cette stratégie, notamment en ciblant les organes ou les cellules à transférer et pourrait ainsi éviter l'apparition d'une réponse immunitaire. Cela ouvrirait alors la voie à l'utilisation des IVT mRNA codant pour des FVIII à demi-vie allongée, permettant encore

l'augmentation du temps de présence dans le plasma. Cette technologie, à la vue des quantités de FVIII produite, pourrait également être envisagée dans le cadre de protocoles d'induction de tolérance immunitaire (ITI).

Avec le deuxième aspect de ma thèse, je me suis intéressé à la complication la plus redoutée chez les patients hémophiles A. L'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII chez 25 à 30% des patients constitue en effet une réelle impasse thérapeutique. Malgré l'existence des protocoles d'ITI, cette complication engendre une dégradation importante de la qualité de vie des patients, le triplement du prix de la prise en charge et les ITI ne sont couronnés de succès que dans 60 à 80% des cas<sup>67</sup>. Si les étapes précoces de la réponse anti-FVIII sont encore mal comprises, les acteurs cellulaires impliqués sont, eux, bien identifiés. Parmi eux, les lymphocytes B (LB) constituent une cible thérapeutique de choix puisqu'ils vont donner les plasmocytes qui produisent les inhibiteurs, ainsi que les cellules mémoires. C'est pourquoi de nombreuses études ont ciblé les LB anti-FVIII naïfs pour induire une tolérance au FVIII<sup>299,320,361</sup>. Les LB sont activés par liaison de l'antigène sur leur BCR et une façon de les inhiber consiste à empêcher la transduction du signal en aval du BCR. Pour cela, la Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) représente une cible idéale puisqu'elle est en amont de l'ensemble des voies de signalisation contrôlées par le BCR. En collaboration avec Sandrine Delignat, nous avons évalué l'effet du PF-06250112, un inhibiteur réversible de la Btk développé par Pfizer, sur la réponse immunitaire anti-FVIII. Nous avons commencé l'étude en validant l'inhibition dose-dépendante et spécifique de la voie de signalisation du BCR *in vitro* et *in vivo* par le PF-06250112. Puis nous avons montré, en traitant des souris déficientes en FVIII avec l'inhibiteur de la Btk pendant 5 jours par semaine, que cet inhibiteur ne permettait pas de prévenir l'apparition de la réponse anti-FVIII. En effet, le jour du deuxième gavage hebdomadaire, les souris ont également été traitées avec du FVIII et au bout de 4 semaines de traitement avec le FVIII et l'inhibiteur de la Btk, nous avons constaté l'apparition d'inhibiteurs. Nous avons également montré que le traitement engendre une diminution de certaines sous-populations de LB de la rate, ainsi que des LT spléniques. Comme il avait été montré que l'inhibition de la Btk a un effet plus important sur les LB exprimant un BCR de forte affinité pour l'antigène<sup>376</sup>, nous avons décidé d'étudier son effet dans le cadre d'une réponse mémoire. Des expériences de transfert adoptif de LB mémoire nous ont

permis de démontrer que le traitement au PF-06250112 permet bien d'inhiber la réponse mémoire anti-FVIII. En effet, les souris receveuses de LB mémoire spécifiques du FVIII ne développent pas de réponse anti-FVIII lorsqu'elles sont traitées avec du FVIII et l'inhibiteur de la Btk. En revanche, lorsque des souris receveuses sont traitées uniquement avec du FVIII, on constate l'apparition d'inhibiteurs. Des expériences de différenciation de LB mémoires *in vitro* nous ont permis de démontrer que l'absence d'inhibiteurs chez les souris traitées avec le PF-06250112 est due à une inhibition de la différenciation des LB mémoire en plasmocytes. Le fait que cet inhibiteur de la Btk soit réversible, lui confère un avantage important. En effet, cette réversibilité laisse supposer une diminution des effets secondaires observés chez des patients traités avec l'ibrutinib, un autre inhibiteur de la Btk approuvé dans le traitement des lymphomes<sup>370</sup>. Cependant, il serait intéressant de coupler ce traitement au PF-06250112 avec une stratégie thérapeutique visant les plasmocytes à longue durée de vie, présents dans la moelle osseuse. Ces cellules qui apparaissent à la suite de la réponse primaire (non inhibée par l'inhibiteur de la Btk) perdent l'expression du BCR et ne sont donc pas ciblées par le PF-06250112. Elles constituent donc une source d'inhibiteurs malgré le traitement avec cet inhibiteur de la Btk.

Pour la dernière partie de ma thèse, je me suis attaché à caractériser un nouveau modèle murin d'hémophilie A. En effet, si de nombreux modèles animaux existent pour l'hémophilie A, les plus couramment utilisés sont les modèles murins. Ces lignées représentent un outil précieux, notamment pour l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII puisqu'elles présentent des caractéristiques immunitaires similaires à celles retrouvées chez le patient<sup>382</sup>. Malgré tout, dans ces modèles, le FVIII est pris en charge par des cellules murines et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) présentent des peptides du FVIII sur un complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) murin. Or, les peptides présentés dépendent de l'affinité du CMH pour les peptides. On peut donc supposer que le répertoire présenté par le CMH II murin est différent de celui présenté par le CMH II, selon qu'il soit murin ou humain. Ainsi, ces modèles ne permettent pas l'étude des répertoires de peptides présentés chez les patients. De plus, ils ne permettent pas la validation *in vivo* de FVIII qui seraient modifiés pour enlever les épitopes T reconnus chez l'humain. C'est pourquoi il y a quelques années, un modèle



murin déficient en FVIII et exprimant l'allèle HLA-DRB1\*15:01 du CMH II humain a été développé<sup>389</sup>. L'utilisation de ce modèle a permis par la suite d'identifier des peptides présentés par cet allèle. Nous avons donc souhaité développer et caractériser un modèle murin déficient en FVIII et en CMH I et II murins, transgénique pour les allèles humains HLA-DRA2.1 et HLA-DRB1\*01:01 du CMH I et II, respectivement. En effet, l'allèle 01:01 est un des allèles les plus présents dans la population caucasienne et représente 10% des patients hémophiles A<sup>144</sup>. J'ai donc caractérisé la production d'anticorps sériques chez les souris transgéniques naïves et j'ai constaté une production augmentée d'IgM totaux et diminuée d'IgG totaux par rapport aux souris déficientes en FVIII. Les populations de LB folliculaires et de LT cytotoxiques sont diminuées, mais la capacité des splénocytes à proliférer est identique dans les deux lignées. J'ai ensuite étudié la réponse anti-FVIII chez ces souris et les ai immunisées avec une injection hebdomadaire de FVIII. Après sept injections, les souris transgéniques développent plus d'IgG anti-FVIII et moins d'IgM anti-FVIII, confirmant la tendance démontrée chez les souris naïves. De même que chez les souris naïves, les splénocytes ont la même capacité à proliférer en réponse à une stimulation au FVIII *ex vivo*. Lorsque j'ai étudié l'expression du HLA-DRB1\*01:01 par les cellules dendritiques ou les LB, j'ai pu confirmer la disparition de l'expression du CMH II murin chez les souris transgéniques, mais je n'ai pas pu détecter l'expression du CMH II humain. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'absence d'expression du CMH II humain par les cellules dendritiques et les LB empêche une bonne communication entre ces cellules et les LT. Il pourrait en résulter un défaut de formation de centres germinatifs, comme décrit dans le syndrome d'hyper IgM (HIGM)<sup>417,419</sup>. Cela pourrait avoir comme conséquence l'absence de mutation hypersomatique et donc expliquer la diminution des IgG anti-FVIII au profit des IgM. Il a été montré que l'interféron gamma permet d'induire l'expression du CMH II par l'intermédiaire de la protéine CIITA<sup>423</sup>. Le traitement de ces souris par l'interféron gamma, ou par CIITA pourrait permettre de rétablir une expression normale du CMH. Ce projet fournirait alors un outil précieux pour l'étude *in vivo* de la réponse immunitaire. Nous pourrions alors identifier les épitopes présentés par le HLA-DRB1\*01:01 et les muter afin d'éviter une présentation du FVIII chez les patients qui l'expriment.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Katzenelson JL. Hemophilia; with special reference to the Talmud. *Harofe Haivri Heb Med J.* 1958;1:165–178.
2. Rosner F. Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann. Intern. Med.* 1969;70(4):833–837.
3. Ingram GI. The history of haemophilia. *J. Clin. Pathol.* 1976;29(6):469–479.
4. Rogaev EI, Grigorenko AP, Faskhutdinova G, Kittler ELW, Moliaka YK. Genotype analysis identifies the cause of the “royal disease.” *Science.* 2009;326(5954):817.
5. Aggeler PM, White SG, Glendening MB, et al. Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency; a new disease resembling hemophilia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1952;79(4):692–694.
6. Biggs R, Austen DE, Denson KW, Rizza CR, Borrett R. The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. I. Antibodies which have second-order concentration graphs. *Br. J. Haematol.* 1972;23(2):125–135.
7. Hoyer LW. Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 1994;330(1):38–47.
8. Graw J, Brackmann H-H, Oldenburg J, et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat. Rev. Genet.* 2005;6(6):488–501.
9. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2014;12(11):1935–1939.
10. Antonarakis SE, Kazazian HH, Tuddenham EG. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Hum. Mutat.* 1995;5(1):1–22.
11. Caviglia HA, Solimeno LP. Orthopedic Surgery in Patients with Hemophilia. Springer Science & Business Media; 2008.
12. Klinge J, Auburger K, Auerswald G, et al. Prevalence and outcome of intracranial haemorrhage in haemophiliacs--a survey of the paediatric group of the German Society of Thrombosis and Haemostasis (GTH). *Eur. J. Pediatr.* 1999;158 Suppl 3:S162-165.
13. Quinones-Hinojosa A, Gulati M, Singh V, Lawton MT. Spontaneous intracerebral hemorrhage due to coagulation disorders. *Neurosurg Focus.* 2003;15(4):E3.
14. Daniele F, Rossi V, Santoro C. Effective management of intracranial haemorrhage with continuous infusion of highly purified von Willebrand factor/factor VIII complex concentrate in an adult with severe haemophilia A. *Blood Transfus.* 2011;9(4):472–474.
15. Ingerslev J, Schwartz M, Lamm LU, et al. Female haemophilia A in a family with seeming extreme bidirectional lyonization tendency: abnormal premature X-chromosome inactivation? *Clin. Genet.* 1989;35(1):41–48.
16. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984;312(5992):326–330.
17. Payne AB, Miller CH, Kelly FM, Michael Soucie J, Craig Hooper W. The CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) mutation list: a new online resource. *Hum. Mutat.* 2013;34(2):E2382-2391.
18. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *MP, Mol. Pathol.* 2002;55(1):1–18.
19. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat. Genet.* 1993;5(3):236–241.
20. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet.* 1993;2(11):1773–1778.
21. Antonarakis SE. Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 1995;74(1):322–328.

22. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2012;119(12):2922–2934.
23. Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, et al. Mutations in the ER–Golgi Intermediate Compartment Protein ERGIC-53 Cause Combined Deficiency of Coagulation Factors V and VIII. *Cell*. 1998;93(1):61–70.
24. Boylan B, Rice AS, De Staercke C, et al. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(6):1036–1042.
25. Stel HV, van der Kwast TH, Veerman EC. Detection of factor VIII/coagulant antigen in human liver tissue. *Nature*. 1983;303(5917):530–532.
26. Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T. Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature*. 1985;317(6039):729–730.
27. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. 1985;317(6039):726–729.
28. Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P. Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1999;274(28):19587–19592.
29. Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood*. 2014;123(24):3706–3713.
30. Pan J, Dinh TT, Rajaraman A, et al. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood*. 2016;128(1):104–109.
31. Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, et al. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood*. 2006;108(2):515–517.
32. Shahani T, Lavend'homme R, Luttun A, et al. Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood*. 2010;115(23):4902–4909.
33. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII. *Nature*. 1984;312(5992):337–342.
34. Shen BW, Spiegel PC, Chang C-H, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood*. 2008;111(3):1240–1247.
35. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998;92(11):3983–3996.
36. Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J. Biol. Chem.* 1998;273(14):8537–8544.
37. Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1988;263(13):6352–6362.
38. Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* 1997;272(39):24121–24124.
39. Lind P, Larsson K, Spira J, et al. Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization. *Eur. J. Biochem.* 1995;232(1):19–27.

40. Nguyen GN, George LA, Siner JI, et al. Novel factor VIII variants with a modified furin cleavage site improve the efficacy of gene therapy for hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2017;15(1):110–121.
41. Siner JI, Samelson-Jones BJ, Crudele JM, et al. Circumventing furin enhances factor VIII biological activity and ameliorates bleeding phenotypes in hemophilia models. *JCI Insight.* 2016;1(16):e89371.
42. Fay PJ. Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988;262(2):525–531.
43. Bihoreau N, Pin S, de Kersabiec AM, Vidot F, Fontaine-Aupart MP. Copper-atom identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII-delta II. *Eur. J. Biochem.* 1994;222(1):41–48.
44. Sudhakar K, Fay PJ. Effects of copper on the structure and function of factor VIII subunits: evidence for an auxiliary role for copper ions in cofactor activity. *Biochemistry.* 1998;37(19):6874–6882.
45. Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JC, et al. Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood.* 1996;87(5):1809–1816.
46. Dimitrov JD, Christophe OD, Kang J, et al. Thermodynamic analysis of the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *Biochemistry.* 2012;51(20):4108–4116.
47. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1991;266(2):740–746.
48. Gringeri A, Ofosu FA, Grancha S, et al. Understanding FVIII/VWF complex--report from a symposium of XXIX WFH meeting 2010. *Haemophilia.* 2012;18(3):469–475.
49. Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1994;269(15):11601–11605.
50. Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, et al. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature.* 1999;402(6760):439–442.
51. Lillicrap D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand? *Thromb. Res.* 2008;122 Suppl 4:S2-8.
52. Morfini M, Mannucci PM, Tenconi PM, et al. Pharmacokinetics of monoclonally-purified and recombinant factor VIII in patients with severe von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 1993;70(2):270–272.
53. van Dijk K, van der Bom JG, Lenting PJ, et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. *Haematologica.* 2005;90(4):494–498.
54. Mufti AH, Ogiwara K, Swystun LL, et al. The common VWF single nucleotide variants c.2365A>G and c.2385T>C modify VWF biosynthesis and clearance. *Blood Adv.* 2018;2(13):1585–1594.
55. Song J, Chen F, Campos M, et al. Quantitative Influence of ABO Blood Groups on Factor VIII and Its Ratio to von Willebrand Factor, Novel Observations from an ARIC Study of 11,673 Subjects. *PLoS ONE.* 2015;10(8):e0132626.
56. Orfeo T, Brufatto N, Nesheim ME, et al. The factor V activation paradox. *J. Biol. Chem.* 2004;279(19):19580–19591.
57. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry.* 1986;25(2):505–512.

58. Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988;85(16):5829–5833.
59. Lillis AP, Muratoglu SC, Au DT, et al. LDL Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Regulates Cholesterol Accumulation in Macrophages. *PLoS ONE.* 2015;10(6):e0128903.
60. Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 1999;274(34):23734–23739.
61. Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, et al. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood.* 2003;101(10):3933–3939.
62. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J. Biol. Chem.* 1999;274(53):37685–37692.
63. Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL. Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 2001;276(15):11970–11979.
64. Ananyeva NM, Makogonenko YM, Sarafanov AG, et al. Interaction of coagulation factor VIII with members of the low-density lipoprotein receptor family follows common mechanism and involves consensus residues within the A2 binding site 484-509. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2008;19(6):543–555.
65. Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJM. LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood.* 2005;106(3):906–912.
66. Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJM, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3(6):1257–1265.
67. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet.* 2016;388(10040):187–197.
68. Castaman G, Linari S. Pharmacokinetic drug evaluation of recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018;14(2):143–151.
69. Berntorp E. Prophylactic therapy for haemophilia: early experience. *Haemophilia.* 2003;9 Suppl 1:5–9; discussion 9.
70. Jiménez-Yuste V, Auerswald G, Benson G, et al. Achieving and maintaining an optimal trough level for prophylaxis in haemophilia: the past, the present and the future. *Blood Transfus.* 2014;12(3):314–319.
71. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N. Engl. J. Med.* 2007;357(6):535–544.
72. Carcao MD, Aledort L. Prophylactic factor replacement in hemophilia. *Blood Rev.* 2004;18(2):101–113.
73. Josic D, Schwinn H, Stadler M, Strancar A. Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 1994;662(2):181–190.
74. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 2001;344(23):1773–1779.
75. Ironside J. W. Variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Haemophilia.* 2010;16(s5):175–180.

76. Basilico F, Nardini I, Mori F, et al. Characterization of factor VIII pharmaceutical preparations by means of MudPIT proteomic approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(1):50–57.
77. Mancuso ME, Mannucci PM, Rocino A, et al. Source and purity of factor VIII products as risk factors for inhibitor development in patients with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(5):781–790.
78. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature.* 1984;312(5992):342–347.
79. Casademunt E, Martinelle K, Jernberg M, et al. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur. J. Haematol.* 2012;89(2):165–176.
80. Hedner U, Glazer S, Pingel K, et al. Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe hemophilia A during synovectomy. *Lancet.* 1988;2(8621):1193.
81. Hilgartner MW, Knatterud GL. The use of factor eight inhibitor by-passing activity (FEIBA immuno) product for treatment of bleeding episodes in hemophiliacs with inhibitors. *Blood.* 1983;61(1):36–40.
82. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1994;269(50):31869–31880.
83. Hamedani NS, Rühl H, Zimmermann JJ, et al. In Vitro Evaluation of Aptamer-Based Reversible Inhibition of Anticoagulant Activated Protein C as a Novel Supportive Hemostatic Approach. *Nucleic Acid Ther.* 2016;26(6):355–362.
84. Polderdijk SGI, Adams TE, Ivanciu L, et al. Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia. *Blood.* 2017;129(1):105–113.
85. Broze GJ, Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:262–280.
86. Chowdary P, Lethagen S, Friedrich U, et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(5):743–754.
87. Petersen LC. Hemostatic properties of a TFPI antibody. *Thromb. Res.* 2012;129 Suppl 2:S44-45.
88. Chowdary P. Inhibition of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) as a Treatment for Hemophilia: Rationale with Focus on Concizumab. *Drugs.* 2018;78(9):881–890.
89. Lu G, Broze GJ, Krishnaswamy S. Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J. Biol. Chem.* 2004;279(17):17241–17249.
90. Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat. Med.* 2015;21(5):492–497.
91. von Mackensen S, Kalnins W, Krucker J, et al. Hemophilia patients' unmet needs and their expectations of the new extended half-life factor concentrates. *Haemophilia.* 2017;23(4):566–574.
92. Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM, COCIS Study Group. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood.* 2003;102(7):2358–2363.
93. Henry N, Jovanović J, Schlueter M, et al. Cost-utility analysis of life-long prophylaxis with recombinant factor VIII Fc vs recombinant factor VIII for the management of severe hemophilia A in Sweden. *J Med Econ.* 2018;21(4):318–325.

94. Ober RJ, Martinez C, Lai X, Zhou J, Ward ES. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(30):11076–11081.
95. Powell JS, Josephson NC, Quon D, et al. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood.* 2012;119(13):3031–3037.
96. Balkaransingh P, Young G. Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A. *Ther Adv Hematol.* 2018;9(2):49–61.
97. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):214–221.
98. Tiede A, Brand B, Fischer R, et al. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2013;11(4):670–678.
99. Hampton K, Chowdary P, Dunkley S, et al. First report on the safety and efficacy of an extended half-life glycoPEGylated recombinant FVIII for major surgery in severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2017;23(5):689–696.
100. Zollner S, Raquet E, Claar P, et al. Non-clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb. Res.* 2014;134(1):125–131.
101. Mahlangu J, Kuliczkowski K, Karim FA, et al. Efficacy and safety of rVIII-SingleChain: results of a phase 1/3 multicenter clinical trial in severe hemophilia A. *Blood.* 2016;128(5):630–637.
102. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood.* 2016;128(16):2007–2016.
103. Cafuir LA, Kempton CL. Current and emerging factor VIII replacement products for hemophilia A. *Ther Adv Hematol.* 2017;8(10):303–313.
104. Graf L. Extended Half-Life Factor VIII and Factor IX Preparations. *Transfus Med Hemother.* 2018;45(2):86–91.
105. Scott LJ, Kim ES. Emicizumab-kxwh: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(2):269–274.
106. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.* 2012;18(10):1570–1574.
107. Arruda VR, Doshi BS, Samelson-Jones BJ. Novel approaches to hemophilia therapy: successes and challenges. *Blood.* 2017;130(21):2251–2256.
108. Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, et al. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood.* 2016;127(13):1633–1641.
109. Shima M, Lillicrap D, Kruse-Jarres R. Alternative therapies for the management of inhibitors. *Haemophilia.* 2016;22 Suppl 5:36–41.
110. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(9):809–818.
111. Franchini M, Mannucci PM. Non-factor replacement therapy for haemophilia: a current update. *Blood Transfus.* 2018;1–5.
112. Oldenburg J, Kulkarni R, Srivastava A, et al. Improved joint health in subjects with severe haemophilia A treated prophylactically with recombinant factor VIII Fc fusion protein. *Haemophilia.* 2017;



113. Sampei Z, Igawa T, Soeda T, et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57479.
114. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood*. 2017;130(23):2463–2468.
115. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(25):2357–2365.
116. George LA. Hemophilia gene therapy comes of age. *Blood Adv.* 2017;1(26):2591–2599.
117. Holehonnur R, Lella SK, Ho A, Luong JA, Ploski JE. The production of viral vectors designed to express large and difficult to express transgenes within neurons. *Mol Brain*. 2015;8:.
118. Clément N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16002.
119. Maheshri N, Koerber JT, Kaspar BK, Schaffer DV. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat. Biotechnol.* 2006;24(2):198–204.
120. Arruda VR, Xiao W. It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world. *J. Thromb. Haemost.* 2007;5(1):12–15.
121. McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*. 2013;121(17):3335–3344.
122. Bunting S, Zhang L, Xie L, et al. Gene Therapy with BMN 270 Results in Therapeutic Levels of FVIII in Mice and Primates and Normalization of Bleeding in Hemophilic Mice. *Mol. Ther.* 2018;26(2):496–509.
123. Hartmann J, Croteau SE. 2017 Clinical trials update: Innovations in hemophilia therapy. *Am. J. Hematol.* 2016;91(12):1252–1260.
124. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(26):2519–2530.
125. Calcedo R, Morizono H, Wang L, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011;18(9):1586–1588.
126. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*. 2013;122(1):23–36.
127. Li C, Narkbunnam N, Samulski RJ, et al. Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene Ther.* 2012;19(3):288–294.
128. 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.
129. de Biasi R, Rocino A, Papa ML, et al. Incidence of factor VIII inhibitor development in hemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates. *Thromb. Haemost.* 1994;71(5):544–547.
130. DiMichele DM. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia.* 2000;6 Suppl 1:38–40.
131. Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, et al. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood*. 2013;122(11):1954–1962.

132. Darby SC, Keeling DM, Spooner RJD, et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J. Thromb. Haemost.* 2004;2(7):1047-1054.
133. Lannoy N, Hermans C. Principles of genetic variations and molecular diseases: applications in hemophilia A. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016;104:1-8.
134. Astermark J. Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia.* 2010;16(102):66-70.
135. Hay CR. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia.* 1998;4(4):558-563.
136. Pandey GS, Yanover C, Miller-Jenkins LM, et al. Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22-inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A. *Nat. Med.* 2013;19(10):1318-1324.
137. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, et al. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica.* 2005;90(7):924-931.
138. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, et al. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb. Haemost.* 1997;77(2):238-242.
139. Pavlova A, Zeitler H, Scharrer I, Brackmann H-H, Oldenburg J. HLA genotype in patients with acquired haemophilia A. *Haemophilia.* 2010;16(102):107-112.
140. Pandey GS, Yanover C, Howard TE, Sauna ZE. Polymorphisms in the F8 gene and MHC-II variants as risk factors for the development of inhibitory anti-factor VIII antibodies during the treatment of hemophilia a: a computational assessment. *PLoS Comput. Biol.* 2013;9(5):e1003066.
141. Pashov AD, Calvez T, Gilardin L, et al. In silico calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the F8 gene. *Haemophilia.* 2014;20(2):176-184.
142. Lozier JN, Rosenberg PS, Goedert JJ, Menashe I. A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2011;17(4):641-649.
143. Hay CR, Ollier W, Pepper L, et al. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb. Haemost.* 1997;77(2):234-237.
144. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, et al. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(12):2006-2015.
145. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:683-765.
146. Pinto P, Ghosh K, Shetty S. Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe haemophilia A patients. *Haemophilia.* 2012;18(5):794-797.
147. Repessé Y, Peyron I, Dimitrov JD, et al. Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the HMOX1 promoter. *Haematologica.* 2013;98(10):1650-1655.
148. Astermark J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood.* 2015;125(13):2045-2051.

149. Franchini M, Coppola A, Mengoli C, et al. Blood Group O Protects against Inhibitor Development in Severe Hemophilia A Patients. *Semin. Thromb. Hemost.* 2017;43(1):69–74.
150. Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL, MIBS Study Group. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia.* 2001;7(3):267–272.
151. Leissinger C, Cooper DL, Solem CT, HTRS Investigators. Assessing the impact of age, race, ethnicity and inhibitor status on functional limitations of patients with severe and moderately severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2011;17(6):884–889.
152. Maclean PS, Richards M, Williams M, et al. Treatment related factors and inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2011;17(2):282–287.
153. Gunasekera D, Ettinger RA, Nakaya Fletcher S, et al. Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients. *Blood.* 2015;126(7):895–904.
154. Kim H-Y, Cho J-H, Kim H-J, et al. Ethnicity-specific impact of HLA I/II genotypes on the risk of inhibitor development: data from Korean patients with severe hemophilia A. *Ann. Hematol.* 2018;
155. Viel KR, Ameri A, Abshire TC, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(16):1618–1627.
156. Iorio A, Fischer K, Makris M. Large scale studies assessing anti-factor VIII antibody development in previously untreated haemophilia A: what has been learned, what to believe and how to learn more. *Br. J. Haematol.* 2017;178(1):20–31.
157. Carcao M, Re W, Ewenstein B. The role of previously untreated patient studies in understanding the development of FVIII inhibitors. *Haemophilia.* 2016;22(1):22–31.
158. Dasgupta S, Navarrete A-M, Bayry J, et al. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(21):8965–8970.
159. Repessé Y, Dasgupta S, Navarrete A-M, et al. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;129(4):1172–1173; author reply 1174–1175.
160. Gangadharan B, Ing M, Delignat S, et al. The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica.* 2017;102(2):271–281.
161. Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, et al. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;129(2):501–509, 509.e1–5.
162. Wroblewska A, van Haren SD, Herczenik E, et al. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood.* 2012;119(22):5294–5300.
163. Pfistershammer K, Stöckl J, Siekmann J, et al. Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb. Haemost.* 2006;96(3):309–316.
164. Teyssandier M, André S, Gupta N, et al. Therapeutic factor VIII does not trigger TLR1.2 and TLR2.6 signalling in vitro. *Haemophilia.* 2013;19(3):399–402.
165. Skupsky J, Zhang A-H, Su Y, Scott DW. A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood.* 2009;114(21):4741–4748.
166. Gangadharan B, Delignat S, Ollivier V, et al. Role of coagulation-associated processes on factor VIII immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2014;12(12):2065–2069.

167. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br. J. Haematol.* 2005;130(3):422–427.
168. Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 2007;109(11):4648–4654.
169. Sharathkumar A, Lillicrap D, Blanchette VS, et al. Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(6):1228–1236.
170. Marcucci M, Mancuso ME, Santagostino E, et al. Type and intensity of FVIII exposure on inhibitor development in PUPs with haemophilia A. A patient-level meta-analysis. *Thromb. Haemost.* 2015;113(5):958–967.
171. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:991–1045.
172. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301–305.
173. Lövgren KM, Søndergaard H, Skov S, Wiinberg B. Non-genetic risk factors in haemophilia A inhibitor management - the danger theory and the use of animal models. *Haemophilia.* 2016;22(5):657–666.
174. Jardim LL, Chaves DG, Silveira-Cassette ACO, et al. Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. *Br. J. Haematol.* 2017;178(6):971–978.
175. Kurnik K, Bidlingmaier C, Engl W, et al. New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia.* 2010;16(2):256–262.
176. Auerswald G, Bidlingmaier C, Kurnik K. Early prophylaxis/FVIII tolerization regimen that avoids immunological danger signals is still effective in minimizing FVIII inhibitor developments in previously untreated patients--long-term follow-up and continuing experience. *Haemophilia.* 2012;18(1):e18-20.
177. Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 2013;121(20):4046–4055.
178. Pradeu T, Jaeger S, Vivier E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13(10):764–769.
179. Auerswald G, Kurnik K, Aledort LM, et al. The EPIC study: a lesson to learn. *Haemophilia.* 2015;21(5):622–628.
180. Bray GL, Gomperts ED, Courter S, et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group. *Blood.* 1994;83(9):2428–2435.
181. Berntorp E. Plasma-derived versus recombinant factor concentrates in PUPs: a never ending debate? *Hamostaseologie.* 2017;37(1):53–57.
182. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia.* 2003;9(4):418–435.
183. Goudemand J, Laurian Y, Calvez T. Risk of inhibitors in haemophilia and the type of factor replacement. *Curr. Opin. Hematol.* 2006;13(5):316–322.
184. Iorio A, Halimeh S, Holzhauser S, et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(6):1256–1265.

185. Mannucci PM, Mancuso ME, Franchini M. Tailoring hemostatic therapies to lower inhibitor development in previously untreated patients with severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14(7):1330–1336.
186. Franchini M, Tagliaferri A, Mengoli C, Cruciani M. Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: a critical systematic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2012;81(1):82–93.
187. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(3):231–239.
188. Peyvandi F, Cannavò A, Garagiola I, et al. Timing and severity of inhibitor development in recombinant versus plasma-derived factor VIII concentrates: a SIPPET analysis. *J. Thromb. Haemost.* 2018;16(1):39–43.
189. ter Avest PC, Fischer K, Mancuso ME, et al. Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6(12):2048–2054.
190. Weert M, Møller EH. Immunogenicity of Biopharmaceuticals. Springer Science & Business Media; 2008.
191. Algiman M, Dietrich G, Nydegger UE, et al. Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(9):3795–3799.
192. Lacroix-Desmazes S, Navarrete A-M, André S, et al. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood.* 2008;112(2):240–249.
193. Whelan SFJ, Hofbauer CJ, Horling FM, et al. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood.* 2013;121(6):1039–1048.
194. Dietrich G, Algiman M, Sultan Y, Nydegger UE, Kazatchkine MD. Origin of anti-idiotypic activity against anti-factor VIII autoantibodies in pools of normal human immunoglobulin G (IVIg). *Blood.* 1992;79(11):2946–2951.
195. Green D, Lechner K. A survey of 215 non-hemophilic patients with inhibitors to Factor VIII. *Thromb. Haemost.* 1981;45(3):200–203.
196. Delgado J, Jimenez-Yuste V, Hernandez-Navarro F, Villar A. Acquired haemophilia: review and meta-analysis focused on therapy and prognostic factors. *Br. J. Haematol.* 2003;121(1):21–35.
197. Sultan Y, Kazatchkine MD, Nydegger U, et al. Intravenous immunoglobulin in the treatment of spontaneously acquired factor VIII:C inhibitors. *Am. J. Med.* 1991;91(5A):35S–39S.
198. Sultan Y, Kazatchkine MD, Maisonneuve P, Nydegger UE. Anti-idiotypic suppression of autoantibodies to factor VIII (antihaemophilic factor) by high-dose intravenous gammaglobulin. *Lancet.* 1984;2(8406):765–768.
199. Rossi F, Sultan Y, Kazatchkine MD. Anti-idiotypes against autoantibodies and alloantibodies to VIII:C (anti-haemophilic factor) are present in therapeutic polyspecific normal immunoglobulins. *Clin. Exp. Immunol.* 1988;74(2):311–316.
200. Gilles JG, Arnout J, Vermynen J, Saint-Remy JM. Anti-factor VIII antibodies of hemophilic patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood.* 1993;82(8):2452–2461.

201. Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood*. 1987;69(5):1475–1480.
202. Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J. Thromb. Haemost.* 2004;2(7):1082–1095.
203. Hofbauer CJ, Whelan SFJ, Hirschler M, et al. Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. *Blood*. 2015;125(7):1180–1188.
204. Arai M, Scandella D, Hoyer LW. Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J. Clin. Invest.* 1989;83(6):1978–1984.
205. Shima M, Scandella D, Yoshioka A, et al. A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb. Haemost.* 1993;69(3):240–246.
206. Dimichele DM. Management of factor VIII inhibitors. *Int. J. Hematol.* 2006;83(2):119–125.
207. Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana null, et al. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat. Med.* 1999;5(9):1044–1047.
208. Lacroix-Desmazes S, Misra N, Bayry J, et al. Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A. *J. Immunol. Methods.* 2002;269(1–2):251–256.
209. Healey JF, Lubin IM, Nakai H, et al. Residues 484-508 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the A2 domain of human factor VIII. *J. Biol. Chem.* 1995;270(24):14505–14509.
210. Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, et al. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood*. 1998;92(10):3701–3709.
211. Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood*. 1998;92(1):136–142.
212. Nogami K, Shima M, Giddings JC, et al. Circulating factor VIII immune complexes in patients with type 2 acquired hemophilia A and protection from activated protein C-mediated proteolysis. *Blood*. 2001;97(3):669–677.
213. Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM. Epitope repertoire of human CD4(+) T cells on the A3 domain of coagulation factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 2004;2(8):1385–1394.
214. Scandella D, Mattingly M, de Graaf S, Fulcher CA. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood*. 1989;74(5):1618–1626.
215. Fulcher CA, Lechner K, de Graaf Mahoney S. Immunoblot analysis shows changes in factor VIII inhibitor chain specificity in factor VIII inhibitor patients over time. *Blood*. 1988;72(4):1348–1356.
216. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb. Haemost.* 1995;73(2):247–251.
217. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh.* 1975;34(2):612.

218. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, et al. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001;85(3):560.
219. Rossetti LC, Szurkalo I, Radic CP, et al. Factor VIII genotype characterization of haemophilia A affected patients with transient and permanent inhibitors: a comprehensive Argentine study of inhibitor risks. *Haemophilia.* 2013;19(4):511–518.
220. Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, et al. Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood.* 1998;92(2):496–506.
221. 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.
222. Georgescu MT, Lai JD, Hough C, Lillicrap D. War and peace: Factor VIII and the adaptive immune response. *Cellular Immunology.* 2016;301:2–7.
223. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(11):1816–1823.
224. van Haren SD, Herczenik E, ten Brinke A, et al. HLA-DR-presented peptide repertoires derived from human monocyte-derived dendritic cells pulsed with blood coagulation factor VIII. *Mol. Cell Proteomics.* 2011;10(6):M110.002246.
225. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(3):166–180.
226. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica.* 2012;97(12):1855–1863.
227. van den Biggelaar M, Madsen JJ, Faber JH, et al. Factor VIII Interacts with the Endocytic Receptor Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 via an Extended Surface Comprising “Hot-Spot” Lysine Residues. *J. Biol. Chem.* 2015;290(27):16463–16476.
228. Navarrete A-M, Dasgupta S, Teyssandier M, et al. Endocytic receptor for pro-coagulant factor VIII: relevance to inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* 2010;104(6):1093–1098.
229. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2012;92(6):1177–1186.
230. Spiegel PC, Jacquemin M, Saint-Remy J-MR, Stoddard BL, Pratt KP. Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4κ Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood.* 2001;98(1):13–19.
231. Dasgupta S, Navarrete AM, André S, et al. Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica.* 2008;93(1):83–89.
232. Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy J-MR, Kotitschke R, Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb. Haemost.* 2002;88(2):221–229.
233. Delignat S, Dasgupta S, André S, et al. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica.* 2007;92(10):1423–1426.
234. Delignat S, Repessé Y, Navarrete A-M, et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia.* 2012;18(2):248–254.

235. Muczynski V, Casari C, Moreau F, et al. A factor VIII-nanobody fusion protein forming an ultra-stable complex with VWF: effect on clearance & antibody formation. *Blood*. 2018;
236. Qadura M, Waters B, Burnett E, et al. Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood*. 2009;114(4):871–880.
237. Lenting PJ, Pegon JN, Christophe OD, Denis CV. Factor VIII and von Willebrand factor--too sweet for their own good. *Haemophilia*. 2010;16 Suppl 5:194–199.
238. Lai JD, Georgescu MT, Hough C, Lillicrap D. To clear or to fear: An innate perspective on factor VIII immunity. *Cell. Immunol*. 2016;301:82–89.
239. Rydz N, Swystun LL, Notley C, et al. The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood*. 2013;121(26):5228–5237.
240. Swystun LL, Lai JD, Notley C, et al. The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII complex half-life and immunogenicity. *J. Clin. Invest*. 2018;
241. Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, Davis FF. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem*. 1977;252(11):3582–3586.
242. Paz P, Xie J, Fuelle L, et al. PEGylated FVIII Exhibits Reduced Immunogenicity in Hemophilia A Mice and In Vitro in Human Cells. *Haemophilia*. 2012;18:93–93.
243. van Helden PM, Unterthurner S, Hermann C, et al. Maintenance and break of immune tolerance against human factor VIII in a new transgenic hemophilic mouse model. *Blood*. 2011;118(13):3698–3707.
244. Ing M, Gupta N, Teyssandier M, et al. Immunogenicity of long-lasting recombinant factor VIII products. *Cell. Immunol*. 2016;301:40–48.
245. Hartholt RB, van Velzen AS, Peyron I, et al. To serve and protect: The modulatory role of von Willebrand factor on factor VIII immunogenicity. *Blood Rev*. 2017;31(5):339–347.
246. Liu T, Hoehn T, Patarroyo-White S, Pierce G, Jiang H. Evaluation of antibody responses to rFVIII-Fc compared to Xyntha (R) and Advate (R) in hemophilia A mice. *Haemophilia*. 2012;18:41–41.
247. Krishnamoorthy S, Valee S, Liu T, et al. Cell-mediated immune response to recombinant factor VIII-Fc in hemophilia A mice. *Haemophilia*. 2012;18:91–91.
248. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood*. 2014;123(3):317–325.
249. Nolan B, Mahlangu J, Perry D, et al. Long-term safety and efficacy of recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) in subjects with haemophilia A. *Haemophilia*. 2016;22(1):72–80.
250. Stasyshyn O, Djambas Khayat C, Iosava G, et al. Safety, efficacy and pharmacokinetics of rVIII-SingleChain in children with severe hemophilia A: results of a multicenter clinical trial. *J. Thromb. Haemost*. 2017;15(4):636–644.
251. Bray GL, Kroner BL, Arkin S, et al. Loss of high-responder inhibitors in patients with severe hemophilia A and human immunodeficiency virus type 1 infection: a report from the Multi-Center Hemophilia Cohort Study. *Am. J. Hematol*. 1993;42(4):375–379.
252. van Niel G, Wubbolts R, Stoorvogel W. Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2008;20(4):437–444.



253. Kamaté C, Lenting PJ, van den Berg HM, Mutis T. Depletion of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> regulatory T cells may enhance or uncover factor VIII-specific T-cell responses in healthy individuals. *J. Thromb. Haemost.* 2007;5(3):611–613.
254. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 2012;30:531–564.
255. Caramalho Í, Nunes-Cabaço H, Foxall RB, Sousa AE. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. *Front Immunol.* 2015;6:395.
256. Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood.* 2000;95(4):1324–1329.
257. Rossi G, Sarkar J, Scandella D. Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood.* 2001;97(9):2750–2757.
258. Singer ST, Addiego JE, Reason DC, Lucas AH. T lymphocyte proliferative responses induced by recombinant factor VIII in hemophilia A patients with inhibitors. *Thromb. Haemost.* 1996;76(1):17–22.
259. Meunier S, Menier C, Marcon E, Lacroix-Desmazes S, Maillère B. CD4 T cells specific for factor VIII are present at high frequency in healthy donors and comprise naïve and memory cells. *Blood Adv.* 2017;1(21):1842–1847.
260. Reding MT, Wu H, Krampf M, et al. Sensitization of CD4<sup>+</sup> T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb. Haemost.* 2000;84(4):643–652.
261. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557–1569.
262. Ettinger RA, James EA, Kwok WW, Thompson AR, Pratt KP. Lineages of human T-cell clones, including T helper 17/T helper 1 cells, isolated at different stages of anti-factor VIII immune responses. *Blood.* 2009;114(7):1423–1428.
263. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* 2016;17(11):1322–1333.
264. Reding MT, Lei S, Lei H, et al. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb. Haemost.* 2002;88(4):568–575.
265. Hu G, Guo D, Key NS, Conti-Fine BM. Cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb. Haemost.* 2007;97(5):788–794.
266. James EA, Kwok WW, Ettinger RA, Thompson AR, Pratt KP. T-cell responses over time in a mild hemophilia A inhibitor subject: epitope identification and transient immunogenicity of the corresponding self-peptide. *J. Thromb. Haemost.* 2007;5(12):2399–2407.
267. Moser K, Muehlinghaus G, Manz R, et al. Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol. Lett.* 2006;103(2):83–85.
268. Zou Y-R, Diamond B. Fate determination of mature autoreactive B cells. *Adv. Immunol.* 2013;118:1–36.
269. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 2012;247(1):52–63.
270. Diaz I, Bolloré K, Tuailon E, et al. Circulating FVIII-specific IgG, IgA and IgM memory B cells from haemophilia A patients. *Haemophilia.* 2016;22(5):799–805.
271. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15(3):137–148.

272. Reipert BM. B-cell memory against factor VIII. *Cellular Immunology*. 2016;301:49–58.
273. Hausl C, Maier E, Schwarz HP, et al. Long-term persistence of anti-factor VIII antibody-secreting cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII. *Thromb. Haemost.* 2002;87(5):840–845.
274. Delignat S, Rayes J, Russick J, et al. Inhibitor Formation in Congenital Hemophilia A: an Immunological Perspective. *Semin. Thromb. Hemost.* 2018;
275. Brackmann HH, Gormsen J. Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder. *Lancet*. 1977;2(8044):933.
276. Brackmann HH, Oldenburg J, Schwaab R. Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' "bonn protocol." *Vox Sang.* 1996;70 Suppl 1:30–35.
277. Mauser-Bunschoten EP, Nieuwenhuis HK, Roosendaal G, van den Berg HM. Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. *Blood*. 1995;86(3):983–988.
278. DiMichele DM, Hoots WK, Pipe SW, Rivard GE, Santagostino E. International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations. *Haemophilia*. 2007;13 Suppl 1:1–22.
279. Valentino LA, Kempton CL, Kruse-Jarres R, et al. US Guidelines for immune tolerance induction in patients with haemophilia a and inhibitors. *Haemophilia*. 2015;21(5):559–567.
280. DiMichele DM, Kroner BL, North American Immune Tolerance Study Group. The North American Immune Tolerance Registry: practices, outcomes, outcome predictors. *Thromb. Haemost.* 2002;87(1):52–57.
281. Hay CRM, DiMichele DM, International Immune Tolerance Study. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood*. 2012;119(6):1335–1344.
282. Schep SJ, Schutgens REG, Fischer K, Boes ML. Review of immune tolerance induction in hemophilia A. *Blood Rev.* 2018;
283. Brackmann H-H, White GC, Berntorp E, Andersen T, Escuriola-Ettingshausen C. Immune tolerance induction: What have we learned over time? *Haemophilia*. 2018;24 Suppl 3:3–14.
284. Mariani G, Kroner B, Immune Tolerance Study Group (ITSG). Immune tolerance in hemophilia with factor VIII inhibitors: predictors of success. *Haematologica*. 2001;86(11):1186–1193.
285. van Velzen AS, Peters M, van der Bom JG, Fijnvandraat K. Effect of von Willebrand factor on inhibitor eradication in patients with severe haemophilia A: a systematic review. *Br. J. Haematol.* 2014;166(4):485–495.
286. Nakar C, Manco-Johnson MJ, Lail A, et al. Prompt immune tolerance induction at inhibitor diagnosis regardless of titre may increase overall success in haemophilia A complicated by inhibitors: experience of two U.S. centres. *Haemophilia*. 2015;21(3):365–373.
287. Kreuz W, Escuriola Ettingshausen C, Vdovin V, et al. First prospective report on immune tolerance in poor risk haemophilia A inhibitor patients with a single factor VIII/von Willebrand factor concentrate in an observational immune tolerance induction study. *Haemophilia*. 2016;22(1):87–95.
288. Antun A, Monahan PE, Manco-Johnson MJ, et al. Inhibitor recurrence after immune tolerance induction: a multicenter retrospective cohort study. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(11):1980–1988.

289. Leissinger C, Josephson CD, Granger S, et al. Rituximab for treatment of inhibitors in haemophilia A. A Phase II study. *Thromb. Haemost.* 2014;112(3):445–458.
290. Jiang L, Liu Y, Zhang L, Santoro C, Rodriguez A. Rituximab for treating inhibitors in people with inherited severe hemophilia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;7:CD010810.
291. Selewski DT, Shah GV, Mody RJ, Rajdev PA, Mukherji SK. Rituximab (Rituxan). *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(7):1178–1180.
292. Collins PW, Mathias M, Hanley J, et al. Rituximab and immune tolerance in severe hemophilia A: a consecutive national cohort. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(5):787–794.
293. Reipert BM, van Helden PMW, van den Helden PMW, Schwarz H-P, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br. J. Haematol.* 2007;136(1):12–25.
294. Waters B, Qadura M, Burnett E, et al. Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response. *Blood.* 2009;113(1):193–203.
295. Han S, Asoyan A, Rabenstein H, Nakano N, Obst R. Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(47):20453–20458.
296. Ohtsuka S, Ogawa S, Wakamatsu E, Abe R. Cell cycle arrest caused by MEK/ERK signaling is a mechanism for suppressing growth of antigen-hyperstimulated effector T cells. *Int. Immunol.* 2016;28(11):547–557.
297. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:367–386.
298. Actor A, Holley C, Csencsits-Smith K. Role of B Cells in Breaking and Maintaining Tolerance to Clotting Factor VIII in Congenital and Acquired Hemophilia A. *Antibodies.* 2014;3(2):192–204.
299. Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, et al. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood.* 2005;106(10):3415–3422.
300. Pautard B, D'Oiron R, Li Thiao Te V, et al. Successful immune tolerance induction by FVIII in hemophilia A patients with inhibitor may occur without deletion of FVIII-specific T cells. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9(6):1163–1170.
301. Gilles JG, Desqueper B, Lenk H, Vermylen J, Saint-Remy JM. Neutralizing anti-idiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients with hemophilia A. *J. Clin. Invest.* 1996;97(6):1382–1388.
302. Sakurai Y, Shima M, Tanaka I, et al. Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. *Haematologica.* 2004;89(6):696–703.
303. Gilles JG. Role of anti-idiotypic antibodies in immune tolerance induction. *Haemophilia.* 2010;16(102):80–83.
304. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* 2004;199(10):1401–1408.
305. Chen T-C, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J. Immunol.* 2004;172(10):5900–5907.

306. Huang H, Ma Y, Dawicki W, Zhang X, Gordon JR. Comparison of induced versus natural regulatory T cells of the same TCR specificity for induction of tolerance to an environmental antigen. *J. Immunol.* 2013;191(3):1136–1143.
307. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* 2009;70(4):326–336.
308. Read S, Greenwald R, Izcue A, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J. Immunol.* 2006;177(7):4376–4383.
309. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 1999;190(7):995–1004.
310. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;24:99–146.
311. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 2007;8(12):1353–1362.
312. Sojka DK, Huang Y-H, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 2008;124(1):13–22.
313. Matsui H, Shibata M, Brown B, et al. A murine model for induction of long-term immunologic tolerance to factor VIII does not require persistent detectable levels of plasma factor VIII and involves contributions from Foxp3+ T regulatory cells. *Blood.* 2009;114(3):677–685.
314. Reipert BM, Sasgary M, Ahmad RU, et al. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. *Thromb. Haemost.* 2001;86(6):1345–1352.
315. Moghimi B, Sack BK, Nayak S, et al. Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9(8):1524–1533.
316. Boyman O, Surh CD, Sprent J. Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2006;6(12):1323–1331.
317. Liu CL, Ye P, Lin J, Djukovic D, Miao CH. Long-term tolerance to factor VIII is achieved by administration of interleukin-2/interleukin-2 monoclonal antibody complexes and low dosages of factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 2014;12(6):921–931.
318. Kim YC, Zhang A-H, Su Y, et al. Engineered antigen-specific human regulatory T cells: immunosuppression of FVIII-specific T- and B-cell responses. *Blood.* 2015;125(7):1107–1115.
319. Pratt KP. Engineering less immunogenic and antigenic FVIII proteins. *Cellular Immunology.* 2016;301:12–17.
320. Scott DW, Pratt KP, Miao CH. Progress toward inducing immunologic tolerance to factor VIII. *Blood.* 2013;121(22):4449–4456.
321. Meslier Y, André S, Dimitrov JD, et al. Bortezomib delays the onset of factor VIII inhibitors in experimental hemophilia A, but fails to eliminate established anti-factor VIII IgG-producing cells: Elimination of factor VIII-specific B cells by bortezomib. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;9(4):719–728.
322. 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.
323. Cousens LP, Tassone R, Mazer BD, et al. Tregitope update: mechanism of action parallels IVIg. *Autoimmun Rev.* 2013;12(3):436–443.

324. Kang Y, Melo M, Deng E, et al. Induction of hyporesponsiveness to intact foreign protein via retroviral-mediated gene expression: the IgG scaffold is important for induction and maintenance of immune hyporesponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(15):8609–8614.
325. Gupta N, Culina S, Meslier Y, et al. Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance. *Sci Transl Med.* 2015;7(275):275ra21.
326. Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, et al. Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. *J. Clin. Invest.* 2006;116(7):1974–1982.
327. Gewirtz J, Thornton MA, Rauova L, Poncz M. Platelet-delivered factor VIII provides limited resistance to anti-factor VIII inhibitors. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6(7):1160–1166.
328. Chen Y, Schroeder JA, Chen J, et al. The immunogenicity of platelet-derived FVIII in hemophilia A mice with or without preexisting anti-FVIII immunity. *Blood.* 2016;127(10):1346–1354.
329. Chen Y, Luo X, Chen J, et al. Immune Tolerance Developed in Platelet-Targeted FVIII Gene Therapy in Hemophilia Mice Is CD4+ T Cell-Mediated. *Blood.* 2015;126(23):1071–1071.
330. Chen Y, Luo X, Schroeder JA, et al. Immune tolerance induced by platelet-targeted factor VIII gene therapy in hemophilia A mice is CD4 T cell mediated. *J. Thromb. Haemost.* 2017;15(10):1994–2004.
331. Karikó K, Muramatsu H, Keller JM, Weissman D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol. Ther.* 2012;20(5):948–953.
332. Puri KD, Di Paolo JA, Gold MR. B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Int. Rev. Immunol.* 2013;32(4):397–427.
333. Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH, Hoyer LW. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 1999;81(2):240–244.
334. Aarntzen EHJG, Schreibelt G, Bol K, et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(19):5460–5470.
335. Kreiter S, Diken M, Selmi A, Türeci Ö, Sahin U. Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy. *Current Opinion in Immunology.* 2011;23(3):399–406.
336. Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(31):13824–13829.
337. Wilgenhof S, Van Nuffel AMT, Benteyn D, et al. A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Ann. Oncol.* 2013;24(10):2686–2693.
338. Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Saebøe-Larssen S, Gaudernack G. Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination. *Cancer Gene Ther.* 2005;12(6):579–591.

339. Kyte JA, Kvalheim G, Lislerud K, et al. T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007;56(5):659–675.
340. Kyte JA, Aamdal S, Dueland S, et al. Immune response and long-term clinical outcome in advanced melanoma patients vaccinated with tumor-mRNA-transfected dendritic cells. *Oncoimmunology.* 2016;5(11):e1232237.
341. Van Lint S, Heirman C, Thielemans K, Breckpot K. mRNA: From a chemical blueprint for protein production to an off-the-shelf therapeutic. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(2):265–274.
342. Kübler H, Scheel B, Gnad-Vogt U, et al. Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study. *J Immunother Cancer.* 2015;3:26.
343. Figlin RA. Personalized immunotherapy ( AGS-003 ) when combined with sunitinib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1241–1248.
344. Lorenzi JCC, Trombone APF, Rocha CD, et al. Intranasal vaccination with messenger RNA as a new approach in gene therapy: use against tuberculosis. *BMC Biotechnol.* 2010;10:77.
345. Hekele A, Bertholet S, Archer J, et al. Rapidly produced SAM(®) vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerg Microbes Infect.* 2013;2(8):e52.
346. Gay CL, DeBenedette MA, Tcherepanova IY, et al. Immunogenicity of AGS-004 Dendritic Cell Therapy in Patients Treated During Acute HIV Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2018;34(1):111–122.
347. Routy J-P, Boulassel M-R, Yassine-Diab B, et al. Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin. Immunol.* 2010;134(2):140–147.
348. Jacobson JM, Routy J-P, Welles S, et al. Dendritic Cell Immunotherapy for HIV-1 Infection Using Autologous HIV-1 RNA: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2016;72(1):31–38.
349. Pardi N, Secreto AJ, Shan X, et al. Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nature Communications.* 2017;8:14630.
350. Zimmermann O, Homann JM, Bangert A, et al. Successful use of mRNA-nucleofection for overexpression of interleukin-10 in murine monocytes/macrophages for anti-inflammatory therapy in a murine model of autoimmune myocarditis. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(6):e003293.
351. Creusot RJ, Chang P, Healey DG, et al. A short pulse of IL-4 delivered by DCs electroporated with modified mRNA can both prevent and treat autoimmune diabetes in NOD mice. *Mol. Ther.* 2010;18(12):2112–2120.
352. Ramaswamy S, Tonnu N, Tachikawa K, et al. Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017;114(10):E1941–E1950.
353. Den Uijl IEM, Mauser Bunschoten EP, Roosendaal G, et al. Clinical severity of haemophilia A: does the classification of the 1950s still stand? *Haemophilia.* 2011;17(6):849–853.
354. Lai JD, Swystun LL, Cartier D, et al. N-linked glycosylation modulates the immunogenicity of recombinant human factor VIII in hemophilia A mice. *Haematologica.* 2018;

355. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther.* 2008;16(11):1833–1840.
356. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165–175.
357. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):e142.
358. Rietwyk S, Peer D. Next-Generation Lipids in RNA Interference Therapeutics. *ACS Nano.* 2017;11(8):7572–7586.
359. Katakowski JA, Mukherjee G, Wilner SE, et al. Delivery of siRNAs to Dendritic Cells Using DEC205-Targeted Lipid Nanoparticles to Inhibit Immune Responses. *Mol. Ther.* 2016;24(1):146–155.
360. Matsui H, Hegadorn C, Ozelo M, et al. A microRNA-regulated and GP64-pseudotyped lentiviral vector mediates stable expression of FVIII in a murine model of Hemophilia A. *Mol. Ther.* 2011;19(4):723–730.
361. Yoon J, Schmidt A, Zhang A-H, et al. FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. *Blood.* 2017;129(2):238–245.
362. Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28:185–210.
363. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer.* 2014;14(4):219–232.
364. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell.* 1993;72(2):279–290.
365. Vetrie D, Vorechovský I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1993;361(6409):226–233.
366. Ng Y-S, Wardemann H, Chelnis J, Cunningham-Rundles C, Meffre E. Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance. *J. Exp. Med.* 2004;200(7):927–934.
367. Herman SEM, Gordon AL, Hertlein E, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011;117(23):6287–6296.
368. Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA, et al. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]. *J. Biol. Chem.* 1999;274(14):9587–9599.
369. Uckun FM, Zheng Y, Cetkovic-Cvrlje M, et al. In vivo pharmacokinetic features, toxicity profile, and chemosensitizing activity of alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2,5-dibromophenyl)propenamide (LFM-A13), a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase. *Clin. Cancer Res.* 2002;8(5):1224–1233.
370. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(3):213–223.

371. Murthy V, Weaving S, Paneesha S. Imbruvica® ▽ (ibrutinib) patient support programme for chronic lymphocytic leukaemia and mantle cell lymphoma. *Br J Nurs*. 2017;26(10):S20–S25.
372. Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2015;100(1):77–86.
373. Reiff SD, Muhowski EM, Guinn D, et al. Non-covalent inhibition of C481S Bruton's tyrosine kinase by GDC-0853: a new treatment strategy for ibrutinib resistant CLL. *Blood*. 2018;
374. Sagiv-Barfi I, Kohrt HEK, Czerwinski DK, et al. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(9):E966–E972.
375. Rankin AL, Seth N, Keegan S, et al. Selective Inhibition of BTK Prevents Murine Lupus and Antibody-Mediated Glomerulonephritis. *The Journal of Immunology*. 2013;191(9):4540–4550.
376. Benson MJ, Rodriguez V, von Schack D, et al. Modeling the clinical phenotype of BTK inhibition in the mature murine immune system. *J. Immunol*. 2014;193(1):185–197.
377. Deeks ED. Ibrutinib: A Review in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs*. 2017;77(2):225–236.
378. Mock J, Kunk PR, Palkimas S, et al. Risk of Major Bleeding with Ibrutinib. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;
379. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N. Engl. J. Med*. 2014;370(24):2286–2294.
380. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, et al. BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2017;35(13):1437–1443.
381. Øvlsen K, Kristensen AT, Tranholm M. In vivo models of haemophilia - status on current knowledge of clinical phenotypes and therapeutic interventions. *Haemophilia*. 2008;14(2):248–259.
382. Giles AR, Tinlin S, Hoogendoorn H, Greenwood P, Greenwood R. Development of factor VIII:C antibodies in dogs with hemophilia A (factor VIII:C deficiency). *Blood*. 1984;63(2):451–456.
383. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, et al. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat. Genet*. 1995;10(1):119–121.
384. Reipert BM, Ahmad RU, Turecek PL, Schwarz HP. Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. *Thromb. Haemost*. 2000;84(5):826–832.
385. Chao BN, Baldwin WH, Healey JF, et al. Characterization of a genetically engineered mouse model of hemophilia A with complete deletion of the F8 gene. *J. Thromb. Haemost*. 2016;14(2):346–355.
386. Nishimura Y, Iwanaga T, Inamitsu T, et al. Expression of the human MHC, HLA-DQW6 genes alters the immune response in C57BL/6 mice. *J. Immunol*. 1990;145(1):353–360.
387. Friese MA, Jensen LT, Willcox N, Fugger L. Humanized mouse models for organ-specific autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol*. 2006;18(6):704–709.
388. Gregersen JW, Holmes S, Fugger L. Humanized animal models for autoimmune diseases. *Tissue Antigens*. 2004;63(5):383–394.



389. 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 E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood*. 2012;119(17):4073–4082.
390. Kwon H, Kim M, Seo Y, et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*. 2018;156:172–193.
391. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13(10):759–780.
392. Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(17):5884–5892.
393. Anderson BR, Muramatsu H, Jha BK, et al. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(21):9329–9338.
394. Zolotukhin I, Markusic DM, Palaschak B, et al. Potential for cellular stress response to hepatic factor VIII expression from AAV vector. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16063.
395. Lange AM, Altynova ES, Nguyen GN, Sabatino DE. Overexpression of factor VIII after AAV delivery is transiently associated with cellular stress in hemophilia A mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16064.
396. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732–738.
397. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526–1529.
398. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12542–12550.
399. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, et al. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity*. 2016;45(4):737–748.
400. Rettig L, Haen SP, Bittermann AG, et al. Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling. *Blood*. 2010;115(22):4533–4541.
401. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(1):46–60.
402. Guan S, Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther*. 2017;24(3):133–143.
403. Li S-D, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):496–504.
404. Sander LE, Davis MJ, Boekschoten MV, et al. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*. 2011;474(7351):385–389.
405. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S54-62.
406. Karimi MH, Geramizadeh B, Malek-Hosseini SA. Tolerance Induction in Liver. *Int J Organ Transplant Med*. 2015;6(2):45–54.
407. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of Controlled Release*. 2015;217:345–351.

408. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012;51(34):8529–8533.
409. Ducret A, Kux van Geijtenbeek S, Röder D, et al. Identification of six cell surface proteins for specific liver targeting. *Proteomics Clin Appl.* 2015;9(7–8):651–661.
410. Ding B-S, Nolan DJ, Butler JM, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010;468(7321):310–315.
411. Liu CL, Lyle MJ, Shin SC, Miao CH. Strategies to target long-lived plasma cells for treating hemophilia A inhibitors. *Cell. Immunol.* 2016;301:65–73.
412. Corneth OBJ, de Bruijn MJW, Rip J, et al. Enhanced Expression of Bruton's Tyrosine Kinase in B Cells Drives Systemic Autoimmunity by Disrupting T Cell Homeostasis. *J. Immunol.* 2016;197(1):58–67.
413. Sharma S, Orłowski G, Song W. Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *J. Immunol.* 2009;182(1):329–339.
414. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity.* 1998;8(3):363–372.
415. Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, et al. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* 2014;123(12):1957–1960.
416. Macauley MS, Pfengle F, Rademacher C, et al. Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. *J. Clin. Invest.* 2013;123(7):3074–3083.
417. Facchetti F, Appiani C, Salvi L, Levy J, Notarangelo LD. Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 1995;154(12):6624–6633.
418. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1994;1(3):167–178.
419. Etzioni A, Ochs HD. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatr. Res.* 2004;56(4):519–525.
420. Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 2000;102(5):565–575.
421. Inaba K, Kitaura M, Kato T, et al. Contrasting effect of alpha/beta- and gamma-interferons on expression of macrophage Ia antigens. *J. Exp. Med.* 1986;163(4):1030–1035.
422. Rohn WM, Lee YJ, Benveniste EN. Regulation of class II MHC expression. *Crit. Rev. Immunol.* 1996;16(3):311–330.
423. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science.* 1994;265(5168):106–109.