

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156774- -00008-0000

Fecha: 2013-08-08 14:54:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 89

Señor

Director de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: Expediente No. **11 156774**

Solicitud de patente PCT entrada en Fase Nacional, para:

"PÉPTIDO FVIII ÚTIL PARA SUPRIMIR O PREVENIR LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE FVIII"

Solicitante: **APITOPE INTERNATIONAL NV**

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

Yo, **Margarita Castellanos Abondano**, identificada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio **No. 8315** notificado por fijación en lista del 5 de junio de 2013, estando dentro del término legal, en los siguientes términos:

De la solicitud de patente

Su despacho concluye que el título no corresponde con el objeto de la solicitud porque fue general. Con el fin de atender esta observación se modifica el título por **PÉPTIDO FVIII ÚTIL PARA SUPRIMIR O PREVENIR LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE FVIII**.

Su Despacho concluye que la descripción no cumple con las disposiciones del artículo 28 de la distinción 486 y que el pliego reivindicatorio de la presente solicitud de patente no cumple con las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486. El Examinador señala lo siguiente:

- "La descripción no es clara porque no proporciona los identificadores SEQ ID NO de todos los péptidos que hacen parte de la solicitud"

- “La reivindicación 1 no es clara puesto que hace referencia a FVIII y MHC; se recuerda al solicitante que la primera vez que se menciona si en el capítulo reivindicatorio debe incluirse la definición de dicha sigla. Por otra parte, el listado de péptidos reclamados no contiene el identificador del SEQ ID NO correspondiente que debe encontrarse en el listado de secuencias adjunto.
- “El capítulo reivindicatorio no se encuentra completamente sustentado en la descripción, las reivindicaciones 1 a 10 hacen referencia a péptidos que han sufrido modificaciones tales como sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos a las secuencias generales citadas en la tabla 1, sin embargo la descripción no demuestra que el solicitante haya obtenido péptidos con cada una de las modificaciones mencionadas, ni que dichos péptidos presenten la actividad deseada. La descripción demuestra en el ejemplo 1 la obtención de los péptidos de la tabla 2 (folio 0093) sin ninguna modificación, los ejemplos 2 a 10 demuestran que de los 12 péptidos obtenidos solo los péptidos 9 y 11 presentan la actividad deseada (folio 0095, último párrafo). Por otra parte el único péptido modificado con sustento en la descripción es el obtenido en el ejemplo 11 (folio 0096) que corresponde a una visión de E al inicio del péptido y una supresión de PY al final del péptido 11 de la tabla 2, y según se demuestra en la figura 9 no mejora su actividad frente al péptido sin modificar. Por tanto, se sugiere al solicitante restringir el alcance de las reivindicaciones a la materia que tiene sustento en la descripción”.

Con el fin de atender las observaciones formuladas a este respecto, y de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, se presenta una nueva versión de la memoria descriptiva y un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 2 reivindicaciones en el cual se eliminaron las reivindicaciones 1-9 y 12-18. De tal manera que, las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por superadas de la siguiente manera:

- Se ha redactado nuevamente el pliego reivindicatorio. Las nuevas reivindicaciones se refieren a un péptido que consiste en la secuencia específica EDNIMVTFRNQASR. Dicho péptido se ejemplifica específicamente en la memoria descriptiva y se demostró que es capaz de inducir tolerancia (ver ejemplos 11 y 12). Dicha secuencia se identificó como SEQ ID NO: 23.
- La memoria descriptiva se modificó a fin de incorporar los SEQ ID Nos para las diferentes secuencias, de acuerdo con el listado de secuencias presentado oportunamente.

De la unidad de invención

Su despacho concluye que la solicitud de patente no tiene unidad invención ya que comprende más de una invención o grupos de invenciones.

Las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por superada con el nuevo capítulo reivindicatorio que consta de tan solo dos reivindicaciones.

Novedad y Nivel inventivo

Su Despacho concluye que el documento (D1) afecta el nivel inventivo de los péptidos 9 y 11 de la reivindicación 1 del capítulo reivindicatorio original. Su Despacho enuncia:

- “El documento D1 se considera el Estado de la técnica cercano la invención definida en la reivindicación 1 porque divulgan un péptido que comprende una secuencia derivada de FVIII (Pág. 7 línea 30), que puede tener las secuencias SEQ ID NO: 2 KWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSS (Tabla 7. Pág. 72) ó SEQ ID NO: 12 GPYIRAEVEDNIMVTFRNQA (Tabla 2. Pág. 62), donde dichas secuencias pueden modificarse adición, supresión o mediante sustituciones conservativas de aminoácidos con el fin de modificar la estructura del péptido o su carga y por ende su hidrofobicidad (Pág. 37 líneas 18 a 31).”
- “La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el documento D1 consiste en que los péptidos de la solicitud han sido modificados por adición de aminoácidos al final del péptido y supresión de aminoácidos al inicio del péptido respecto a D1.”
- “El efecto que logra el incluir la modificación de la secuencia del péptido es mejorar la capacidad de prevenir la formación de anticuerpos inhibidores del factor VIII”
- “Sin embargo, la selección de péptidos derivados de FVIII o la modificación de los mismos para aumentar la capacidad de dichos péptidos en prevenir la formación de anticuerpos inhibidores del factor VIII, ya está divulgada en el documento D1 que divulga también como seleccionar péptidos derivados de FVIII que tengan la actividad deseada por medio de la elaboración de una librería de péptidos que contienen los dominios A3 y C2 de FVIII (Pág. 56 línea 18 a 30).”
- “En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia se vería motivada a utilizar los métodos de selección de péptidos descritos en el documento D1 (Pág. 56 línea 18 a 30), así como las posibles modificaciones de los mismos (Pág. 37 líneas 18 a 31) para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud, por lo cual se considera obvia. “

- “Las reivindicaciones 2, 4, 6, 7, 8 y 11 no presentan características esenciales que hagan novedosa la reivindicación 1, por lo cual se considera tampoco cumplen con requisito de nivel inventivo.”

En cuanto a las objeciones del examinador deseamos poner de presente lo siguiente:

De acuerdo con el artículo 18 de la Decisión 486:

*“**Artículo 18.-** Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”.*

De conformidad con el anterior artículo, se exponen a continuación las razones por las cuales la presente invención posee nivel inventivo frente a las enseñanzas del documento citado D1:

D1 describe un estudio para determinar cuáles péptidos de FVIII son inmunodominantes. D1 no enseña un péptido tal como el que se enseña en la reivindicación 1 (es decir, un péptido que tiene la secuencia EDNIMVTFRNQASR. El péptido más parecido en D1 es GPYIRAEVEDNIMVTFRNQA (SEQ ID NO: 12) y esto no cae dentro del alcance de la reivindicación 1 modificada y esta divulgación no puede inducir a la persona medianamente versada en la materia a derivar de forma evidente la secuencia reivindicada.

D1 tampoco muestra que dicho péptido sería capaz de unirse a una molécula MHC de clase II sin más procesamiento del antígeno y que sea reconocida por una célula T específica para el factor VIII.

Por lo tanto, D1 no enseña ni sugiere a la persona versada en la materia cómo modificar los péptidos allí descritos de manera tal que lleven al péptido reivindicado. Además, D1 no sugiere las propiedades beneficiosas del péptido de la reivindicación 1, es decir, que actúa como apitope para inducir tolerancia al factor VIII y tiene solubilidad mejorada en comparación con el péptido no modificado DNIMVTFRNQASRPY (ver el apartado SOLUBILIDAD en página 21 y tercer párrafo del ejemplo 11).

Por último, se llama la atención del Señor Examinador sobre el hecho de que si bien en D1, página 37 renglones 18-31, se mencionan de manera muy general sustituciones de aminoácidos para los péptidos allí divulgados, en D1 no se dan indicaciones específicas,

explícitas para que la persona medianamente versada en la materia pueda deducir de manera evidente cómo llegar concretamente al péptido reivindicado en la presente solicitud.

Tanto es así, que el señor examinador no hizo, ni podía hacerlo, el ejercicio de intentar llegar a la secuencia del péptido reivindicado en la presente solicitud siguiendo los lineamientos consignados en D1. Esto se debe a que para producir un péptido tal como se reivindicó en la presente solicitud a partir del estado de la técnica se requiere realizar una actividad inventiva. Para poder deducir de manera evidente el péptido reivindicado en la presente solicitud a partir de D1, este documento debería contener indicaciones precisas para hacerlo.

No ha sido posible encontrar en D1 sustento a la afirmación del señor examinador (“la selección de péptidos derivados de FVIII o la modificación de los mismos para aumentar la capacidad de dichos péptidos en prevenir la formación de anticuerpos inhibidores del factor VIII, ya está divulgada en el documento D1 que divulga también como seleccionar péptidos derivados de FVIII que tengan la actividad deseada por medio de la elaboración de una librería de péptidos que contienen los dominios A3 y C2 de FVIII” (Pág. 56 línea 18 a 30)). En este aparte del documento D1 se menciona el repertorio de apitope en el factor VIII humano reconocido por células CD4⁺ de ratones de hemofilia A. En este párrafo no se menciona nada con respecto a la selección de péptidos. En la página 59 de D1 si se menciona la selección y la síntesis de péptido. Allí se indica que se sintetizó una librería de péptidos que se solapan de acuerdo con el método de Houghten la cual abarca la secuencia de amino ácido de los dominios FVIII A3 y C2 y que los dominios A3 y C2 contienen sitios de enlace para inhibidores de anticuerpos. No obstante, esta información no es suficiente para conducir a la persona medianamente versada en la materia hacia el péptido reivindicado en la presente solicitud.

Por lo tanto, la enseñanza del documento D1 no motiva a la persona versada en la materia a derivar de manera evidente el péptido reivindicado que posee la secuencia indicada en la reivindicación 1 del capítulo reivindicatorio modificado.

Dado que la presente solicitud cumple con las disposiciones de los artículos 30, 16 y 18 de la Decisión 486, respetuosamente solicito a ese Despacho que se proceda con la concesión de la presente solicitud.

Anexos

- Nuevo capítulo descriptivo

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por dos (2) reivindicaciones.

Señor Director,


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** de C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá, D.C.
Tel.: 7560770

- 8 AGO. 2013
Bogotá D.C.
MCA/
P2348
MEMORIAL RESPUESTA EXAMEN DE FONDO

PÉPTIDO FVIII ÚTIL PARA SUPRIMIR O PREVENIR LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE FVIII

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un péptido. En particular, se refiere a péptidos cuya al menos secuencia núcleo es derivable del factor VIII (FVIII). Los péptidos pueden ser utilizados para reducir o prevenir la formación de anticuerpos del inhibidor del factor VIII, por ejemplo en el tratamiento de la hemofilia A y la hemofilia adquirida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

HEMOFILIA

La hemofilia pertenece a un grupo de trastornos sanguíneos hereditarios que incluye hemofilia A, hemofilia B (enfermedad de Christmas) y enfermedad de Von Willebrand.

En la hemofilia, la capacidad de la sangre de coagularse es severamente reducida debido a que un factor de coagulación esencial está faltando en parte o por completo, dando como resultado un mayor tiempo de sangrado.

La hemofilia A es una deficiencia del factor de coagulación VIII, mientras que la Hemofilia B es una deficiencia del factor de coagulación IX. En ambas enfermedades, el gen defectuoso es encontrado en el cromosoma X, de modo que las condiciones son vinculadas a X. La hemofilia A es cinco veces más común que la hemofilia B.

La hemofilia es una afección genética heredada que dura toda la vida, que afecta a las mujeres como portadores y a los hombres quienes heredan la afección. Alrededor de un tercio de los nuevos diagnósticos son donde no existen antecedentes familiares previos. Aparece en el mundo entero y ocurre en todos los grupos raciales. Aproximadamente 6.000 personas padecen hemofilia en el Reino Unido.

Los hemofílicos sangran durante un período prolongado luego de lesión. Las lesiones externas tales como cortes y rasguños en general no representan problemas serios: a menudo es posible detener el sangrado aplicando un grado de presión y cubriendo el área afectada (por ej., con una curita).

El problema principal es el sangrado interno en articulaciones, músculos y tejidos blandos, el cual puede producirse en forma espontánea. El sangrado interno, tal como las hemorragias en el cerebro, es muy difícil de manejar y puede ser fatal. El sangrado repetido en las articulaciones causa un dolor agudo y puede causar artritis y/o daño a las articulaciones a largo plazo lo cual conduce a la incapacidad.

El tratamiento para la hemofilia es en general mediante reemplazo del factor de coagulación faltante. En la hemofilia leve o moderada, pueden suministrarse inyecciones en el momento de producirse el sangrado (terapia a demanda). Sin embargo, en la hemofilia severa, se suministran inyecciones profilácticas regulares para ayudar a la sangre a coagularse y reducir al mínimo la posibilidad de daño articular a largo plazo.

Una complicación potencialmente seria de la terapia de reemplazo del factor de coagulación para la hemofilia A es el desarrollo de anticuerpos que neutralizan la función procoagulante del factor VIII. Se producen inhibidores del factor VIII en aproximadamente 25% de aquellas personas con hemofilia A severa. Puesto que los pacientes con hemofilia A congénita pueden ser genéticamente deficientes en FVIII, la síntesis de inhibidores es una respuesta aloinmune a la proteína extraña administrada para prevenir o tratar episodios de sangrado.

Los linfocitos T CD4+ juegan un rol central en la respuesta inmune al FVIII. Luego de ser absorbidos por células que presentan antígenos (APCs, por sus siglas en inglés), FVIII sufre degradación proteolítica convirtiéndose en fragmentos peptídicos (Reding *et al* (2006) Haemophilia 12(sup. 6) 30-36). Luego, estos péptidos son presentados sobre la superficie de la APC en asociación con moléculas de clase II de MHC. A continuación, este complejo es reconocido por el receptor de linfocitos T de una célula CD4+ específica para FVIII. En presencia de las señales coestimuladoras apropiadas, este reconocimiento finalmente hace que la célula CD4+ dirija la síntesis de anticuerpos por células B. La incidencia de la formación de inhibidores inicialmente aumenta con la cantidad de tratamientos con el factor VIII, pero parece nivelarse después de 50-100 días de exposición. La formación de inhibidores es mucho más común en la hemofilia severa que en la enfermedad moderada o leve y algunos defectos moleculares, más claramente delecciones grandes y mutaciones sin sentido en la cadena liviana del factor VIII, parecen predisponer a la formación de inhibidores. Parámetros tales como la concentración, tipo (purificado o recombinante) de factor de reemplazo, y antecedentes de tratamiento también pueden afectar sobre la posibilidad de producción de anticuerpos.

El manejo de pacientes con hemofilia con inhibidores es un desafío permanente. La inducción de tolerancia inmune (ITI, por sus siglas en inglés) utilizando una técnica de desensibilización es exitosa en algunos pacientes con aloanticuerpos contra el factor VIII. Este enfoque terapéutico requiere una exposición prolongada a terapia de reemplazo del factor, de modo que es una estrategia a largo plazo.

Si bien ITI puede dar buenos resultados, una proporción significativa (alrededor del 30%) de los pacientes no responden a ITI. Los pacientes con títulos elevados de inhibidor tienen muchas menos posibilidades de responder al tratamiento. Otro factor contribuyente

significativo es la edad en el comienzo del inicio de la ITI, con tasas de buenos resultados muy reducidas cuando es pacientes es mayor que 20 (Hay *et al* (2005) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32:15-21)

Cuando la terapia de ITI no da buenos resultados, el inhibidor generalmente persiste de por vida, y puesto que dichos pacientes son en general respondedores elevados, es necesario tratar episodios de sangrado con productos de derivación de FVIII, tales como concentrados del complejo de protrombina activado (FEIBATM), y FVII activado recombinante. Sin embargo, el uso de dichos agentes está asociado con eventos adversos tales como coagulación intravascular diseminada, infarto de miocardio agudo, embolia pulmonar y trombosis (Acharya y DiMichele (2006) *Best Practice & Research Clinical Haematology* 19:51-66).

La terapia inmunosupresiva es algunas veces empleada para pacientes que no responde a ITI. El tratamiento incluye la administración de drogas inmunosupresivas tales como ciclofosfamida, prednisona, azatioprina y ciclosporina las cuales se dirigen no específicamente al sistema inmune. Estos tratamientos pueden tener efectos colaterales asociados con la inmunosupresión general.

Existe un renovado interés por la depleción de linfocitos B selectiva empleando RituximabTM, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el antígeno CD20 de linfocitos B. Sin embargo, se han producido en algunos niños tratados con esta droga reacciones a la infusión, enfermedad sérica e infecciones oportunistas (DiMichele (2007) *J Thromb Haemost* 5:143-50).

HEMOFILIA ADQUIRIDA

La hemofilia adquirida es una afección autoinmune rara la cual afecta a entre 1 y 4 personas de cada millón. En esta afección, los sujetos que no nacen con hemofilia desarrollan anticuerpos contra uno de los factores de coagulación tal como el factor VIII. Se cree que el embarazo y las enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoidea y el cáncer pueden aumentar el riesgo de desarrollar hemofilia adquirida. Si bien hay diferencias en los mecanismos inmunes subyacentes que conducen a su producción, las manifestaciones clínicas de los inhibidores de FVIII producidos como respuesta a la terapia de reemplazo del factor de coagulación y aquellos producidos en la hemofilia adquirida son similares.

Los pacientes que padecen hemofilia adquirida tienen una tasa de mortalidad que se acerca al 25%, en parte debido a la asociación de inhibidores adquiridos con complicaciones de sangrado severas. La terapia de inhibidores de autoanticuerpos adquiridos se basa principalmente en la necesidad de controlar o prevenir complicaciones hemorrágicas agudas, las cuales con frecuencia son amenazadoras de la vida y de las

extremidades y, en segundo lugar, erradicar el autoanticuerpo para restaurar la coagulación normal.

Algunos sangrados asociados con inhibidores de autoanticuerpos de títulos bajos (< 5 Unidades Bethesda) pueden ser tratados eficazmente con concentrados de FVIII administrados en dosis elevadas. El concentrado del FVIII porcino fue en principio considerado una terapia de primera línea crítica para el sangrado relacionado con la hemofilia adquirida ya que era la única terapia de reemplazo que proporcionaba una oportunidad de medir realmente los niveles de actividad de coagulación de FVIII pos-infusión en el laboratorio. El producto fue retirado del mercado en el 2004 debido a la contaminación de los pools de plasma porcinos por el parvovirus porcino. En la actualidad, los agentes de "derivación" son de uso común, pero existen potenciales riesgos de trombogenicidad y hay solo alrededor del 80% de eficacia para cada producto. El intercambio plasmático por medio de plasmaferesis e inmunoadsorción extracorpórea puede ser necesario para reducir temporalmente el título de inhibidor de manera suficiente como para que los agentes de derivación o reemplazo de FVIII proporcionen hemostasis adecuada.

La erradicación de inhibidores de autoanticuerpos depende de medidas inmunosupresivas, tales como: (1) administración de corticosteroides con 30%–50% de eficacia en 3–6 semanas; (2) uso de agentes quimioterapéuticos citotóxicos y mielosupresivos, por ej., ciclofosfamida, ciclosporina, 2-clorodesoxiadenosina; (3) inmunomodulación con inmunoglobulina intravenosa; y (4) depleción de linfocitos B selectiva con rituximab. Los respondedores a RituximabTM pueden requerir el uso concurrente de esteroides y las personas que sufren recaídas pueden responder al retratamiento.

Por lo tanto, todos los métodos actualmente disponibles para reducir la producción de autoanticuerpos asociada con el tratamiento de la hemofilia A, y la producción de autoanticuerpos en la hemofilia adquirida, tienen inconvenientes. Por consiguiente, existe la necesidad de brindar métodos mejorados para resolver el tema de los anticuerpos anti-FVIII en la hemofilia A y en la hemofilia adquirida.

Los presentes inventores han descubierto que es posible evitar la formación de anticuerpos inhibidores de FVIII mediante la pre-tolerización del paciente con péptidos derivados de FVIII.

SÍNTESIS DE ASPECTOS DE LA INVENCION

El primer aspecto de la presente invención, por lo tanto, se refiere a un péptido, cuya por lo menos parte de la secuencia es derivable de FVIII, el cual es capaz de inducir o restaurar la tolerancia a FVIII.

En una primera realización, la presente invención proporciona un péptido que comprende una de las siguientes secuencias derivadas de FVIII:

SECUENCIA	SEQ ID NO:
GTLMVFFGNVDSSGI	13
TQTLHKFILLFAVFD	2
SLYISQFIIMYSLDG	3
PPIIARYIRLHPHY	4
PPLLTRYLRIHPQSW	5
MHTVNGYVNRSLPGL	6
LGQFLLFCHISSHQH	7
DTLLIIFKNQASRPY	8
PRCLTRYYSFVNME	9
TENIQRFLPNPAGVQ	10
DNIMVTFRNQASRPY	11
RYLRIHPQSWVHQIA	12

con una o más de las siguientes modificaciones:

- (i) remoción de uno o más aminoácidos hidrófobos;
- (ii) reemplazo de uno o más aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófilos cargados; y
- (iii) inserción de un aminoácido cargado en uno o ambos terminales (i)

péptido modificado que es capaz de unirse a una molécula de clase II de MHC sin procesamiento adición de antígenos y reconocido por un linfocito T específico del factor VIII.

El péptido “original” (no modificado) puede ser PRCLTRYYSFVNME (SEQ ID NO: 9) o DNIMVTFRNQASRPY (SEQ ID NO: 11)

En una segunda realización, la presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia

$$X(aa)_n\text{-secuencia núcleo -(aa)}_m$$

donde X es un residuo hidrófilo cargado;

aa es un aminoácido;

n es un número entero entre 0 y 5;

m es un número entero entre 0 y 5; y

la "secuencia núcleo" se selecciona del siguiente grupo de péptidos derivados de FVIII:

LYISQFIIM (SEQ ID NO: 14)

FIIMYSLDG (SEQ ID NO: 15)

IARYIRLHP (SEQ ID NO: 16)

LIIFKNQAS (SEQ ID NO: 17)

LTRYYSFV (SEQ ID NO: 18)

MVTFRNQAS (SEQ ID NO: 19)

LRIHPQSWV (SEQ ID NO: 20)

péptido que es capaz de unirse a una molécula de clase II de MHC sin procesamiento antigénico adicional y que es reconocido por un linfocito T específico del factor VIII.

Por ejemplo, el péptido puede comprender la secuencia

XDNIMVTFRNQAS (SEQ ID NO: 21).

En una tercera realización, la presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia:

$Y(aa)_n\text{-secuencia núcleo}-(aa)_mZ$

donde Y y Z son aminoácidos cargados que tienen polaridad inversa;

aa es un aminoácido;

n es un número entero entre 0 y 5;

m es un número entero entre 0 y 5; y

la "secuencia núcleo" se selecciona del siguiente grupo de péptidos derivados de FVIII:

LYISQFIIM (SEQ ID NO: 14)

FIIMYSLDG (SEQ ID NO: 15)

IARYIRLHP (SEQ ID NO: 16)

LIIFKNQAS (SEQ ID NO: 17)

LTRYYSFV (SEQ ID NO: 18)

MVTFRNQAS (SEQ ID NO: 19)

LRIHPQSWV (SEQ ID NO: 20)

dicho péptido es capaz de unirse a una molécula clase II de MHC sin procesamiento antigénico adicional y de ser reconocido por un linfocito T específico para el factor VIII.

Por ejemplo, el péptido puede comprender la secuencia:

YDNIMVTFRNQASZ (SEQ ID NO: 22)

En la tercera realización, por ejemplo, Y puede ser un aminoácido cargado positivamente y Z puede ser un aminoácido cargado negativamente. Alternativamente, Y puede ser un aminoácido cargado negativamente y Z puede ser un aminoácido cargado positivamente.

Un aminoácido hidrófilo cargado puede ser, por ejemplo, D, E, K, H o R. Un aminoácido cargado positivamente puede ser, por ejemplo K, H o R. Un aminoácido cargado negativamente puede ser, a modo de ejemplo D o E.

El péptido del primer aspecto de la invención puede comprender, por ejemplo, o consistir en, la secuencia EDNIMVTFRNQASR (SEQ ID NO: 23).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos del primer aspecto de la invención. La composición puede comprender una pluralidad de péptidos entera o parcialmente derivables de FVIII los cuales son capaces de inducir o restaurar la tolerancia a FVIII.

La composición puede estar en la forma de un kit, en el cual se proporciona la pluralidad de péptidos por separado para la subsiguiente administración, consecutiva o simultánea, por separado.

El péptido o una composición de la invención puede ser para utilizar en la supresión, reducción o prevención del desarrollo de anticuerpos inhibidores del factor VIII.

La presente invención proporciona además el uso de ese tipo de péptido o composición en la manufactura de un medicamento para suprimir, reducir o prevenir el desarrollo de anticuerpos inhibidores del factor VIII.

La presente invención provee además un método para suprimir, prevenir o reducir el desarrollo de anticuerpos inhibidores del Factor VIII en un sujeto, que comprende el paso de la administración de dicho péptido o composición al sujeto.

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

Alternativamente, el sujeto puede tener, o correr riesgo de contraer, hemofilia adquirida.

Los inhibidores del factor VIII son encontrados, más frecuentemente, en individuos que expresan HLA-DR2. El sujeto tratado mediante el método de la invención puede, por ende, ser HLA-DR2 positivo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Respuestas de memoria para células de nódulos linfáticos (LNC, por sus siglas en inglés) de ratones FVIII+DR2+ cebados con rhFVIII/CFA

- a) proliferación de LNC a péptidos de FVIII 1-6
- b) proliferación de LNC a péptidos de FVIII 7-12
- c) proliferación de LNC a péptidos de FVIII 1, 3 y 11

Figura 2: Ejemplos representativos de clones de hibridoma de linfocitos T FVIII+DR2+ específicos para péptidos derivados de FVIII

Figura 3: Respuestas de memoria para LNC de ratones FVIII-DR2+ cebados con rhFVIII/CFA

Figura 4: Ejemplos representativos de clones de hibridoma de linfocitos T FVIII-DR2+ específicos para péptidos derivados de FVIII

Figura 5: clones FVIII-/- específicos para a) DNIMV (SEQ ID NO: 11) y b) PRCLT (SEQ ID NO: 9)

Figura 6: Respuestas de memoria para LNC a FVIII para ratones FVIII+DR2+ tratados 3x i.p. con péptido con anterioridad al cebado ("priming") con rhFVIII/CFA.

Figura 7: Determinación del rango de epítomos de péptidos capaces de funcionar como apítomos utilizando clones de hibridoma de linfocitos T FVIII-DR2+ T específicos para péptidos superpuestos derivados de FVIII. El péptido original se denomina 0. Un cambio de aminoácido hacia la terminal N es -1, dos cambios de aminoácidos hacia la terminal N es -2 etc. Un cambio hacia la terminal C es +1 etc.

Figura 8: Producción de IFN-gamma de células de nódulos linfáticos como respuesta a FVIII para ratones FVIII-DR2+ tratados con péptidos derivados de FVIII PRCLT (SEQ ID NO: 9), DNIMV (SEQ ID NO: 11) o una mezcla de ambos de éstos.

Figura 9: Respuestas de ratones no afectados al tratamiento o tolerizados estimulados con EDNIMVTFRNQASR (EDNIMV) o con un péptido control (DNIMV).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

PÉPTIDO

La presente invención se refiere a un péptido.

El término "péptido" es empleado en el sentido normal para significar una serie de residuos, típicamente L-aminoácidos, conectados uno al otro típicamente mediante

enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos peptídicos sintéticos.

El péptido de la presente invención puede ser preparado empleando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín.). Por ejemplo, los péptidos pueden ser sintetizados mediante técnicas en fase sólida (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), disociados de la resina, y purificados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa (por ej., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman y Co, Nueva York NY). Puede lograrse la síntesis automatizada, por ejemplo, utilizando el Sintetizador Peptídico ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido puede prepararse, alternativamente, por medios recombinantes, o por disociación del péptido del factor VIII seguido por modificación de uno o ambos extremos. La composición de un péptido puede ser confirmada mediante análisis o secuenciamiento de aminoácidos (por ej., el procedimiento de degradación Edman).

Por motivos de practicidad, existen diversas otras características las cuales el péptido puede mostrar. Por ejemplo, es importante que el péptido sea suficientemente estable *in vivo* para ser terapéuticamente útil. La vida media del péptido *in vivo* puede ser de por lo menos 10 minutos, 30 minutos, 4 horas, o 24 horas.

El péptido también puede demostrar buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido puede mantener una conformación *in vivo* la cual permite su unión a una molécula de MHC en la superficie celular sin indebido impedimento.

RESIDUOS NÚCLEO

En una respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T son capaces de reconocer epítopos internos de un antígeno de proteína. Las células que presentan antígeno (APC, por sus siglas en inglés) absorben antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido puede unirse a una molécula de clase I o II del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, por sus siglas en inglés) dentro de la célula y puede ser llevado a la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular en conjunto con una molécula del MHC, el péptido puede ser reconocido por un linfocito T (por medio del receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés)), en cuyo caso el péptido es un epítipo de linfocitos T.

Por ende, un epítipo es un péptido derivable de un antígeno el cual es capaz de unirse a la hendidura de unión peptídica de una molécula de clase I o II de MHC y ser reconocido por un linfocito T.

El epítopo mínimo es el fragmento más corto derivable de un epítopo, el cual es capaz de unirse a la hendidura de unión al péptido de una molécula de clase I o II de MHC y de ser reconocido por un linfocito T. Para una región inmunógena determinada, es típicamente posible generar un "conjunto anidado" de péptidos superpuestos los cuales actúan como epítopos, todos los cuales contienen el epítopo mínimo pero difieren en sus regiones flanqueantes.

Por el mismo motivo, es posible identificar el epítopo mínimo para una combinación de molécula del MHC: linfocito T en particular midiendo la respuesta a péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta al péptido que comprende residuos 1-15 en la genoteca superpuesta, los conjuntos que están truncados en ambos extremos (es decir, 1-14, 1-13, 1-12 etc. y 2-15, 3-15, 4-15 etc.) pueden utilizarse para identificar el epítopo mínimo.

La presente invención proporciona péptidos que comprenden una secuencia de "residuo núcleo" de FVIII que se selecciona de la siguiente lista:

LYISQFIIM (SEQ ID NO: 14)
 FIIMYSLDG (SEQ ID NO: 15)
 IARYIRLHP (SEQ ID NO: 16)
 LIIFKNQAS (SEQ ID NO: 17)
 LTRYYSFV (SEQ ID NO: 18)
 MVTFRNQAS (SEQ ID NO: 19)
 LRIHPQSWV (SEQ ID NO: 20)

Estas secuencias de residuos núcleo fueron pronosticadas utilizando algoritmos de unión a HLA-DR2 para representar o comprender el epítopo mínimo para cada región, según lo mostrado en los Ejemplos.

APÍTOPOS

Los presentes inventores han determinado previamente que existe un vínculo entre la capacidad de un péptido de unirse a una molécula de clase I o II del MHC y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento posterior del antígeno, y la capacidad del péptido de inducir tolerancia *in vivo* (WO 02/16410). Si un péptido es demasiado largo para unirse a la hendidura de unión al péptido de una molécula del MHC sin procesamiento posterior (por ej., recorte ("trimming")), o se une en una conformación inapropiada entonces no será tolerogénico *in vivo*. Si, por el contrario, el péptido es de un tamaño y conformación apropiados para unirse directamente a la hendidura de unión peptídica de MHC y ser presentado a un linfocito T, entonces este péptido puede ser pronosticado como útil para la inducción de tolerancia.

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

Los péptidos de la presente invención son apítosos (epiTOPOS Independientes del Procesamiento de Antígenos ("Antigen Processing-Independent epiTOPES")) en el sentido de que son capaces de unirse a una molécula de clase II del MHC y estimular una respuesta de linfocitos T específicos para el factor VIII sin procesamiento posterior de antígenos. Se puede predecir que dichos apítosos causan tolerancia a FVIII, siguiendo el método basado en reglas descrito en WO 02/16410.

Un péptido de la presente invención puede ser cualquier longitud que sea capaz de unirse a una molécula de clase I o II del MHC sin procesamiento posterior. Típicamente, el péptido de la presente invención es capaz de unirse a la clase II del MHC.

Los péptidos que se unen a las moléculas de clase I del MHC son típicamente 7 a 13, más generalmente 8 a 10 aminoácidos de largo. La unión del péptido es estabilizada en sus dos extremos por contactos entre átomos en la cadena principal del péptido y sitios invariantes en la hendidura de unión al péptido de todas las moléculas de clase I del MHC. Existen sitios invariantes en ambos extremos de la hendidura que unen los terminales amino y carboxi del péptido. Las variaciones en la longitud peptídica son adaptadas por un doblez en la estructura peptídica, a menudo en residuos prolina o glicina que permiten la flexibilidad requerida.

Los péptidos los cuales se unen a moléculas de clase II del MHC tienen típicamente una longitud de entre 8 y 20 aminoácidos, más generalmente una longitud de entre 10 y 17 aminoácidos y pueden ser más largos (por ejemplo hasta 40 aminoácidos). Estos péptidos yacen en una conformación extendida a lo largo de la hendidura de unión al péptido II de MHC la cual (a diferencia de la hendidura de unión al péptido de clase I de MHC) está abierta en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente mediante contactos atómicos de cadena principal con residuos conservados que alinean a la hendidura de unión al péptido.

SECUENCIAS PEPTÍDICAS

La primera realización de la invención se refiere a un péptido que comprende una de las siguientes secuencias derivadas de FVIII:

GTLMVFFGNVDSSGI (SEQ ID NO: 13)
TQTLHKFILLFAVFD (SEQ ID NO: 2)
SLYISQFIIMYSLDG (SEQ ID NO: 3)

PPIIARYIRLHPTHY (SEQ ID NO: 4)
PPLLTRYLRIHPQSW (SEQ ID NO: 5)
MHTVNGYVNRSLPGL (SEQ ID NO: 6)
LGQFLLFCHISSHQH (SEQ ID NO: 7)
DTLLIIFKNQASRPY (SEQ ID NO: 8)
PRCLTRYYSFVNME (SEQ ID NO: 9)
TENIQRFLPNPAGVQ (SEQ ID NO: 10)
DNIMVTFRNQASRPY (SEQ ID NO: 11)
RYLRIHPQSWVHQIA (SEQ ID NO: 12)

con una o más de las siguientes modificaciones:

- (i) remoción de uno o más aminoácidos hidrófobos;
- (ii) reemplazo de uno o más aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófilos cargados; y
- (iii) inserción de un aminoácido cargado en uno o ambos terminales (i)

péptido modificado el cual es capaz de unirse a una molécula de clase II de MHC sin procesamiento posterior de antígenos y de ser reconocido por un linfocito T específico para el factor VIII.

Una lista de aminoácidos convencionales, junto con su polaridad de cadena lateral, carga e índice de hidropatía se proporciona en la Tabla 1.

Tabla 1

Aminoácido	de 3 letras	1 letra	Polaridad de cadena lateral	Carga de cadena lateral (pH 7)	Índice de hidropatía
Alanina	Ala	A	no polar	neutra	1,8
Arginina	Arg	R	polar	positiva	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutra	-3,5
Acido aspártico	Asp	D	polar	negativa	-3,5
Cisteína	Cys	C	no polar	neutra	2,5
Acido glutámico	Glu	E	polar	negativa	-3,5

Glutamina	Gln	Q	polar	neutra	-3,5
Glicina	Gly	G	no polar	neutra	-0,4
Histidina	His	H	polar	positiva	-3,2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutra	4,5
Leucina	Leu	L	no polar	neutra	3,8
Lisina	Lys	K	polar	positiva	-3,9
Metionina	Met	M	no polar	neutra	1,9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutra	2,8
Prolina	Pro	P	no polar	neutra	-1,6
Serina	Ser	S	polar	neutra	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutra	-0,7
Triptofano	Trp	W	no polar	neutra	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutra	-1,3
Valina	Val	V	no polar	neutra	4,2

Los aminoácidos hidrófobos incluyen: G, C, M, A, P, I, L, V y los aminoácidos aromáticos F y W. Los aminoácidos hidrófobos pueden ser eliminados de los extremos de la secuencia o dentro de la secuencia.

Los aminoácidos hidrófilos cargados incluyen: K, R, D, H y E. Los aminoácidos hidrófobos pueden ser intercambiados con aminoácidos hidrófilos cargados en los extremos de la secuencia o dentro de la secuencia.

Uno o más aminoácidos cargados pueden ser insertados en el término N de la secuencia. Ventajosamente, un aminoácido cargado positivamente es insertado o sustituido en un terminal y un aminoácido cargado negativamente es insertado/ sustituido en el otro terminal a fin de crear un dipolo de carga.

La modificación de la secuencia original no debería menoscabar de manera significativa la unión del péptido a la hendidura de unión al péptido de una molécula de MHC, su capacidad a ser reconocida por un linfocito T, o su capacidad de actuar como un apítopo (unirse a una molécula de MHC y presentarse a un linfocito T sin procesamiento posterior de antígenos). Esto puede ser fácilmente analizado empleando ensayos de presentación de antígenos conocidos e hibridomas de linfocitos T.

La segunda realización de la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia

$X(aa)_n$ -secuencia núcleo $-(aa)_m$

donde X es un residuo hidrófilo cargado;

aa es un aminoácido;

n es un número entero entre 0 y 5;

m es un número entero entre 0 y 5; y

la "secuencia núcleo" se selecciona del siguiente grupo de péptidos derivados de FVIII:

LYISQFIIM (SEQ ID NO: 14)

FIIMYSLDG (SEQ ID NO: 15)

IARYIRLHP (SEQ ID NO: 16)

LIIFKNQAS (SEQ ID NO: 17)

LTRYYSFV (SEQ ID NO: 18)

MVTFRNQAS (SEQ ID NO: 19)

LRIHPQSWV (SEQ ID NO: 20)

dicho péptido es capaz de unirse a una molécula clase II de MHC sin procesamiento antigénico adicional y de ser reconocido por un linfocito T específico para el factor VIII.

La secuencia $(aa)_n$ o $(aa)_m$ puede ser cualquier secuencia de entre 4 y 5 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido puede tener la secuencia:

XDNIMVTFRNQAS (SEQ ID NO: 21)

en cuyo caso, $n=3$ y $m=0$.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia:

$Y(aa)_n$ -secuencia núcleo $-(aa)_mZ$

donde Y y Z son aminoácidos cargados que tienen polaridad inversa;

aa es un aminoácido;

n es un número entero entre 0 y 5;

m es un número entero entre 0 y 5; y

la "secuencia núcleo" se selecciona del siguiente grupo de péptidos derivados de FVIII:

LYISQFIIM (SEQ ID NO: 14)

FIIMYSLDG (SEQ ID NO: 15)

IARYIRLHP (SEQ ID NO: 16)

LIIFKNQAS (SEQ ID NO: 17)

LTRYYSFV (SEQ ID NO: 18)

MVTFRNQAS (SEQ ID NO: 19)

LRIHPQSWV (SEQ ID NO: 20)

dicho péptido es capaz de unirse a una molécula clase II de MHC sin procesamiento antigénico adicional y de ser reconocido por un linfocito T específico para el factor VIII.

Por ejemplo, para el péptido EDNIMVTFRNQASR, (SEQ ID NO: 23)

Y=E;

(aa)_n = DNI

m=0; y

Z=R

El péptido puede comprender la secuencia de residuos núcleo, junto con secuencias flanqueantes adicionales en el extremo terminal N y/o C ((aa)_n y (aa)_m respectivamente), siempre que el péptido resultante sea capaz de unirse a una molécula de clase II de MHC sin procesamiento posterior de antígenos.

Las secuencias de terminal N y/o C flanqueantes pueden ser derivables de las secuencias que flanquean las secuencias de residuos núcleo en FVIII humano.

APIPS (siglas en inglés para “sistemas de presentación independientes del procesamiento”)

Se conocen diversos sistemas de presentación independientes del procesamiento, incluyendo:

- a) APC fija (con o sin anticuerpos contra CD28);
- b) Membranas lipídicas que contienen moléculas del MHC Clase I o II (con o sin anticuerpos contra CD28); y
- c) MHC natural o recombinante purificado en forma unida a la placa (con o sin anticuerpos contra CD28).

Todos estos sistemas son capaces de presentar antígeno en conjunto con una molécula del MHC, pero son incapaces de procesar el antígeno. En todos estos sistemas, la función de procesamiento está ausente o inhabilitada. Esto hace posible investigar si un péptido puede unirse a una molécula de clase I o II del MHC y ser presentada a un linfocito T sin procesamiento posterior de antígeno.

El uso de APC fijo para investigar respuestas de linfocitos T es bien conocido en la técnica, por ejemplo, en estudios para investigar el epítipo mínimo dentro de un polipéptido, midiendo la respuesta a péptidos truncados (Fairchild *et al* (1996) *Int. Immunol.* 8:1035-1043). APC puede fijarse utilizando, por ejemplo formaldehído (en general paraformaldehído) o glutaraldehído.

Las membranas lipídicas (las cuales pueden ser membranas o liposomas planos) pueden ser preparadas utilizando lípidos artificiales o pueden ser fracciones de membrana plasmática/ microsómicas de APC.

En el uso, los APIPS pueden ser aplicados a los pocillos de una placa de cultivo tisular. Luego, los antígenos del péptido son agregados y la unión del péptido a la porción del MHC de los APIPS se detecta mediante la adición de líneas o clones de linfocitos T seleccionados. La activación de la línea o clon de linfocitos T puede medirse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo por medio de incorporación de ^3H -timidina o secreción de citoquinas.

FACTOR VIII

La secuencia núcleo de péptido de la invención es derivable del factor VIII. Una o ambas secuencias flanqueantes $((\text{aa})_n$ y $(\text{aa})_m$) también pueden ser derivables del factor VIII.

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

El gen del factor VIII produce dos transcritos alternativamente cortados y empalmados. La variante 1 del transcripto codifica una glicoproteína grande, la isoforma a, la cual circula en el plasma y se asocia con el factor von Willebrand en un complejo no covalente. Esta proteína sufre múltiples eventos de disociación. La variante 2 del transcripto codifica una proteína pequeña putativa, la isoforma b, la cual consiste básicamente en el dominio de unión al fosfolípido del factor VIIIc. Este dominio de unión es esencial para la actividad coagulante.

La secuencia de 186.000 pares de bases completa del gen del factor VIII humano fue elucidada a mediados de los años 80 (Gitschier et al (1984) Nature 312 326-330). En el mismo momento, se utilizaron clones de ADN que codifican la secuencia de 2351 aminoácidos completa para producir el factor VIII biológicamente activo en células de mamífero cultivadas (Wood et al (1984) Nature 312:330-337). La secuencia completa de 2.351 aminoácidos para el factor VIII humano se proporciona en SEC ID No. 1.

Los residuos núcleo del péptido de la presente invención son derivables del factor VIII. Opcionalmente, la o las secuencias flanqueantes también pueden ser derivables del factor VIII si son las mismas que las secuencia que flanquean la secuencia núcleo en el polipéptido del FVIII natural. Esta secuencia puede ser obtenible o puede obtenerse de la disociación de la secuencia del factor VIII.

SOLUBILIDAD

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

GTLMVFFGNVDSSGI (SEQ ID NO: 13)
TQTLHKFILLFAVFD (SEQ ID NO: 2)
SLYISQFIIMYSLDG (SEQ ID NO: 3)
PPIIARYIRLHPHY (SEQ ID NO: 4)
PPLLTRYLRIHPQSW (SEQ ID NO: 5)
MHTVNGYVNRSLPGL (SEQ ID NO: 6)
LGQFLLFCHISSHQH (SEQ ID NO: 7)
DTLLIIFKNQASRPY (SEQ ID NO: 8)
PRCLTRYSSFVNME (SEQ ID NO: 9)
TENIQRFLPNPAGVQ (SEQ ID NO: 10)
DNIMVTFRNQASRPY (SEQ ID NO: 11)
RYLRIHPQSWVHQIA (SEQ ID NO: 12)

Estos péptidos ya se ha demostrado que actúan como apítos y que son tolerogénicos *in vivo* (Ver los ejemplos y la solicitud de patente internacional No PCT/GB2008/003996).

Se ha dado a conocer que la solubilidad es una consideración importante en la inducción de tolerancia mediada por el péptido. La solubilidad puede ser mejorada por uno o más de los siguientes:

- (i) remoción de uno o más residuos hidrófobos;
- (ii) adición/ sustitución para agregar uno o más residuos hidrófilos cargados
- (iii) colocar aminoácidos cargados positiva y negativamente en cualquiera de los dos extremos para crear un dipolo de carga.

El péptido modificado puede ser más soluble que el péptido original (sin modificar). El péptido modificado puede tener una solubilidad 2, 3, 4 o 5 veces superior que el péptido original. El péptido puede ser soluble en concentraciones de hasta 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, o 5 mg/ml.

TOLERANCIA

Los epítos de linfocitos T juegan un rol central en la respuesta inmune adaptativa a cualquier antígeno, ya sea autoantígeno o antígeno extraño. El rol central desempeñado por los epítos de linfocitos T en enfermedades de hipersensibilidad (las cuales incluyen alergia, enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes) ha sido

demostrado a través del uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de epítomos de linfocitos T) en combinación con adyuvante.

Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir tolerancia inmunológica hacia antígenos particulares mediante la administración de epítomos de péptidos en forma soluble. La administración de antígenos de péptidos solubles ha demostrado ser un medio eficaz para inhibir la enfermedad en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE – un modelo para la esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu y Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton y Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes, y uveoretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) según lo anterior). Esto también ha sido demostrado como un medio para tratar una enfermedad prolongada e EAE (Anderton y Wraith (1998) según lo mencionado).

La tolerancia es la falla a respuesta a un antígeno. La tolerancia a auto-antígenos es una característica esencial del sistema inmune, cuando esto se pierde, puede resultar una enfermedad autoinmune. El sistema inmune adaptativo debe mantener la capacidad de responder a una variedad enorme de agentes infecciosos evitando al mismo tiempo el ataque autoinmune de los auto-antígenos contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto es controlado, en gran medida, por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los auto antígenos son detectados en el timo, de modo que la muerte de timocitos auto-reactivos permanece incompleta. Existen por ende mecanismos por los cuales puede adquirirse tolerancia por parte de los linfocitos T auto-reactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). Una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica se brinda en Anderton *et al* (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

En la hemofilia A, los pacientes tienen un defecto en el gen del factor VIII. Esto significa que el factor VIII no es reconocido como un "auto" antígeno por el sistema inmune. Cuando se administra el factor VIII durante la terapia de reemplazo del factor de coagulación, por consiguiente, se genera una respuesta aloinmune a la proteína extraña, lo cual conduce a la producción de anticuerpos inhibidores de FVIII.

Los péptidos de la presente invención son capaces de inducir tolerancia al factor VIII de modo que cuando se administra el FVIII terapéuticamente, no induce una respuesta inmune y no se desarrollan inhibidores de FVIII.

La hemofilia adquirida es una enfermedad autoinmune en la cual la tolerancia al factor VIII se rompe. En este caso, los péptidos de la presente invención pueden ser

administrados para reinstaurar la tolerancia a esta auto proteína y reducir la respuesta inmune patogénica.

La tolerancia puede ser el resultado de la inducción de anergia, o caracterizarse por dicha inducción en por lo menos una porción de los linfocitos T CD4+. A fin de activar un linfocito T, un péptido debe asociarse con un APC "profesional" capaz de suministrar dos señales a linfocitos T. La primera señal (señal 1) es suministrada por el complejo de MHC-péptido en la superficie celular del APC y es recibida por el linfocito T por medio de la TCR. La segunda señal (señal 2) es suministrada por moléculas coestimuladoras sobre la superficie del APC, tal como CD80 y CD86, y es recibida por CD28 sobre la superficie del linfocito T. Se cree que cuando un linfocito T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no es activado y, de hecho, se vuelve anérgico. Los linfocitos T anérgicos son refractarios al subsiguiente desafío antigénico, y pueden ser capaces de suprimir otras respuestas inmunes. Los linfocitos T anérgicos se cree que están involucrados en la mediación de la tolerancia de linfocitos T.

Sin desear estar limitados por teoría alguna, los presentes inventores predicen que los péptidos que requieren procesamiento antes de que puedan ser presentados en conjunto con moléculas MHC no inducen tolerancia puesto que tienen que ser manipulados por células presentadoras de antígenos maduras. Las células presentadoras de antígenos maduras (tales como los macrófagos, células B y células dendríticas) son capaces de procesar antígenos, pero también de suministrar ambas señales 1 y 2 a un linfocito T, lo cual conduce a una activación de linfocitos T. Los apítomos, por otro lado, serán capaces de unirse a MHC de clase II en APC inmaduras. Por lo tanto, será presentada a linfocitos T sin coestimulación, lo cual conduce a anergia de linfocitos T y tolerancia.

Naturalmente, los apítomos son también capaces de unirse a moléculas MHC en la superficie celular de APC madura. Sin embargo, el sistema inmune contiene una mayor abundancia de APC inmaduras que maduras (se ha sugerido que se activan menos del 10% de células dendríticas, Summers et al. (2001) Am. J. Pathol. **159**: 285-295). La posición de error a un apítomo será, por ende, anergia/ tolerancia más que activación.

La inducción de la tolerancia al FVIII puede ser monitoreada *in vivo* buscando una reducción en el nivel de:

- (i) anticuerpos inhibidores de FVIII;
 - (ii) linfocitos T CD4+ específicos para FVIII
 - (iii) células B capaces de secretar anticuerpos inhibidores de FVIII
- mediante técnicas conocidas en el arte.

Se ha demostrado que, cuando se induce tolerancia por la administración de péptidos, se reduce la capacidad de los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno de proliferar. Asimismo, la producción de IL-2, IFN- γ y la producción de IL-4 por parte de estas células es regulada en forma descendente, pero la producción de IL-10 es aumentada. La neutralización de IL-10 en ratones en un estado de tolerancia inducida por péptidos ha demostrado restaurar la susceptibilidad a la enfermedad por completo. Se ha propuesto que una población de células reguladoras persiste en el estado tolerante las cuales producen IL-10 e intervienen en la regulación inmunológica (Burkhart *et al* (1999) Int. Immunol. **11**:1625-1634).

Por lo tanto, la inducción de tolerancia también puede ser monitoreada por diversas técnicas que incluyen:

- (a) la inducción de anergia en linfocitos T CD4+ (los cuales pueden ser detectados por desafíos posteriores con FVIII *in vitro*);
- (b) cambios en la población de linfocitos T CD4+, incluyendo
 - (i) reducción de la proliferación;
 - (ii) regulación descendente en la producción de IL-2, IFN- γ y IL-4; y
 - (iii) aumento de la producción de IL-10.

En el presente contexto, el término "tolerogénico" significa capaz de inducir tolerancia.

COMPOSICIÓN

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

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

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

Cuando se administra para uso profiláctico, la composición puede reducir o evitar la generación de una respuesta inmune a FVIII. El nivel de respuesta inmune es inferior al que se podría haber obtenido en el paciente en el caso de que no hubiese sido tratado con la composición. El término "reducir" indica que se observa una reducción parcial de la respuesta inmune, tal como una reducción del 50%, 70%, 80% o 90% en la respuesta que se habría observado en el paciente en el caso de que no hubiese sido tratado con la composición (o en la respuesta observada en un paciente no tratado con respecto al mismo marco de tiempo). El término "prevenir" indica que no se observa respuesta inmune apreciable al FVIII.

Cuando se administra para uso terapéutico, la composición puede suprimir una respuesta inmune ya en desarrollo al FVIII. El término "suprimir" indica una reducción del nivel de una respuesta inmune en desarrollo, en comparación con el nivel antes del tratamiento con el péptido, o con el nivel que hubiese sido observado en el mismo punto en el tiempo en el caso de que no se hubiese suministrado el tratamiento.

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

- (i) anticuerpos inhibidores de FVIII:
- (ii) linfocitos T CD4+ específicos para FVIII
- (iii) células B secretoras de anticuerpos inhibidores de FVIII.

La detección de todos estos factores puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas en el campo técnico, tales como ELISA, FACS etc.

El tratamiento con la composición de la presente invención también o alternativamente puede causar anergia en linfocitos T CD4+ específicos para FVIII. La anergia puede ser detectada mediante, por ejemplo, posterior desafío con FVIII *in vitro*.

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

Los inhibidores de FVIII pueden ser detectados por la modificación de Nijmegen del ensayo Bethesda de coagulación, en el cual se analiza la capacidad del plasma del paciente de inactivar FVIII en plasma normal. Una unidad Bethesda es definida como la cantidad de anticuerpo que neutraliza 50% de la actividad de FVIII en plasma, y títulos de 0.6BU o mayores sugieren la presencia de anticuerpo.

Los inhibidores son generalmente clasificados como título bajo si el nivel es <5 BU y título alto si ≥ 5 BU.

El nivel de anticuerpos inhibidores de FVIII circulantes puede ser reducido hasta 90%, 75%, 50%, 20%, 10% 5% del nivel de anticuerpos que hubiesen sido observados en el caso en que el paciente no hubiese recibido el tratamiento.

El nivel de anticuerpos inhibidores de FVIII circulantes puede ser reducido hasta 5, 4, 3, 2, 1 o 0.5 BU.

Los péptidos y la composición de la invención pueden aumentar la cantidad o proporción de FVIII terapéuticamente administrado que está disponible para ayudar a la coagulación en un paciente. Esto se debe a la reducción en los inhibidores de FVIII los cuales pueden eficazmente eliminar una proporción de FVIII de ejercer su función

terapéutica. El péptido o composición de la invención puede aumentar la cantidad de FVIII disponible en, por ejemplo, 10%, 25%, 50% 75% o 100%.

Los péptidos y composición de la invención pueden, por ende, reducir la cantidad de FVIII que debe ser administrada para ayudar a la coagulación en un paciente.

FORMULACIÓN

La composición puede ser preparada como un inyectable, ya sea solución líquida o suspensión; también puede prepararse una forma sólida adecuada para solución en, o suspensión en, líquido con anterioridad a la inyección. La preparación también puede ser emulsionada, o los péptidos encapsulados en liposomas. Los ingredientes activos pueden mezclarse con excipientes los cuales son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol, o similar y sus combinaciones.

Adicionalmente, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y/o agentes reguladores del pH. Las sales de tamponación incluyen fosfato, citrato, acetato. Pueden emplearse ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico para el ajuste del pH. Para la estabilización, se pueden emplear disacáridos tales como sacarosa o trehalosa.

Si la composición comprende una pluralidad de péptidos, la relación relativa de los péptidos puede ser aproximadamente igual. Alternativamente, las relaciones relativas de cada péptido pueden ser alteradas, por ejemplo, para focalizar la respuesta tolerogénica sobre un subconjunto en particular de linfocitos T autorreactivos o si se encuentra que un péptido funciona mejor que los otros en particular tipos HLA.

Después de la formulación, la composición puede ser incorporada en un contenedor estéril el cual es luego cerrado herméticamente y almacenado a una temperatura baja, por ejemplo 4°C, o puede liofilizarse.

Convenientemente, la composición es preparada como un polvo liofilizado (deshidratado por congelación). La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada. Los procedimientos de liofilización son bien conocidos en la técnica, ver, por ejemplo <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Se emplean comúnmente agentes volumétricos con anterioridad a la liofilización, tales como manitol, dextrano o glicina.

La composición puede ser administrada en forma conveniente tal como por rutas oral, intravenosa (cuando es hidrosoluble), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o por supositorio o implante (por ej. utilizando moléculas de liberación lenta).

La composición puede ser ventajosamente administrada por medio de rutas intranasales, subcutánea o intradérmica.

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

El sujeto puede estar pasando por o estar por someterse a terapia de reemplazo coagulante con FVIII.

El sujeto puede estar bajo terapia génica o puede estar por someterse a dicha terapia con el gen FVIII.

El sujeto puede ser un HLA-haplotipo el cual está asociado con una predisposición a desarrollar aloanticuerpos o autoanticuerpos anti-FVIII inhibidores. El sujeto puede expresar HLA-DR2. Los métodos para determinar el haplotipo de HLA de un individuo son conocidos en la técnica.

Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular.

En una realización preferida se puede seguir un protocolo "de aumento progresivo de la dosis", donde se administra una pluralidad de dosis al paciente en concentraciones en ascenso. Ese tipo de enfoque ha sido utilizado, por ejemplo, para péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia del veneno de abeja (Müller *et al* (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 y Akdis *et al* (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

KITS

Convenientemente, si la composición comprende una pluralidad de péptidos, se pueden administrar en forma conjunta, en la forma de una composición mixta o cóctel. Sin embargo, puede haber circunstancias en las cuales es preferible proporcionar los péptidos por separado en la forma de un kit, para la administración simultánea, separada, consecutiva o combinada.

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

La composición farmacéutica o kit de la invención también puede utilizarse para tratar y/o prevenir una enfermedad.

En particular, la composición/kit puede utilizarse para tratar y/o prevenir la hemofilia A o la hemofilia adquirida.

HEMOFILIA A

La hemofilia A (hemofilia clásica), es causada por la deficiencia del Factor VIII.

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

La hemofilia está típicamente dividida en tres clases: severa, moderada y leve, en base al nivel de factor de coagulación en la sangre. En la hemofilia severa, hay menos de 1 por ciento de factor de coagulación normal. El grado de severidad tiende a ser consistente de generación en generación.

En contrario a la creencia popular, los cortes y heridas menores no representan en general una amenaza para los hemofílicos. Más bien, el mayor peligro proviene del sangrado espontáneo que puede producirse en articulaciones y músculos. Esto es más probable que ocurra durante los años de rápido crecimiento, típicamente entre las edades de los 5 y los 15 años.

El sangrado espontáneo repetido en articulaciones puede causar artritis, y que los músculos adyacentes se debiliten. La presión sobre los nervios causada por la acumulación de sangre puede dar como resultado dolor, entumecimiento e incapacidad temporaria de mover el área afectada.

La hemofilia A es generalmente diagnosticada con un análisis de sangre para determinar la eficacia de la coagulación y para investigar si los niveles de los factores de coagulación son anormales.

El desarrollo de factores de coagulación purificados en los años de la década del 70, aislados de sangre donada, mejoró significativamente las expectativas a largo plazo de los hemofílicos. Las personas con hemofilia leve a moderada pueden utilizar el tratamiento con FVIII sobre una base *ad hoc*, mientras que las personas con hemofilia severa pueden requerir tratamiento regular e indefinido.

Previamente, los pacientes recibían concentrados de factor VIII agrupados de miles de donaciones de plasma. Esto condujo a problemas significativos de contaminación con patógenos virales, particularmente el virus de inmunodeficiencia humana y los virus de hepatitis. Las técnicas de purificación de anticuerpos monoclonales, inactivación térmica, y tratamientos con detergentes virucidas han tornado a los concentrados derivados de plasma relativamente seguros.

En la actualidad, la tecnología de ADN recombinante ha proporcionado una serie de productos sintéticos, tales como Recombinate™ y Kogenate™. Kogenate está hecho con el empleo de células de riñón de hámster bebé que expresan factor VIII humano. El

factor resultante es altamente purificado, eliminando cualquier posibilidad de transmisión de virus del plasma.

El péptido o composición de la presente invención puede ser administrado antes y/o durante la terapia de reemplazo del factor VIII.

La hemofilia A es un objetivo ideal de enfermedad para la terapia génica puesto que i) es causada por una mutación en un gen identificado único, ii) un ligero aumento en los niveles del factor de coagulación *in vivo* puede convertir a la hemofilia severa en una enfermedad más leve, y iii) las terapias de reemplazo actuales son consideradas subóptimas. Asimismo, existe un amplio rango de seguridad si existe un "disparo en exceso" ("overshoot") del nivel deseado de actividad de coagulación.

Desafortunadamente, hasta la fecha la promesa de una terapia génica como una cura para la hemofilia no ha sido realizada, principalmente debido a las dificultades para hallar un sistema de administración de genes que sea suficientemente no inmunógeno para permitir la expresión a largo plazo del factor de coagulación.

Los péptidos de la presente invención también serían adecuados para tolerizar a un sujeto con anterioridad a la terapia génica con el factor VIII y/o manejo de la formación de inhibidores de FVIII en un paciente después de la terapia génica.

HEMOFILIA ADQUIRIDA

La hemofilia adquirida es caracterizada por la presencia de inhibidores de autoanticuerpos contra FVIII en individuos con coagulación previamente normal. Es una afección rara, con una incidencia estimada de 1–3 por cada millón en la población por año. La tasa de mortalidad asociada con inhibidores de autoanticuerpos adquiridos se aproxima a 25% contra el riesgo sustancialmente inferior de muerte en aquellos con aloanticuerpos.

En comparación con pacientes con inhibidores de aloanticuerpos, la hemofilia adquirida es caracterizada por: (1) un patrón de sangrado más severo; (2) mayor incidencia en la población mayor de edad; (3) ocurrencia en conjunto con enfermedades autoinmunes subyacentes identificables, enfermedades linfoproliferativas o tumores sólidos, embarazo, y uso de ciertos antibióticos tales como penicilina y sulfonamidas en aproximadamente el 50% de los casos; y (4) actividad inhibidora *in vitro* que sigue un patrón farmacocinético tipo II con neutralización incompleta de la actividad del factor de coagulación buscada por el autoanticuerpo, típicamente dando como resultado niveles de factor VIII residuales que oscilan entre 2%–18% en el plasma de los pacientes.

El péptido o composición de la presente invención puede ser administrado a un paciente con hemofilia adquirida, o a un paciente que se cree que están en riesgo de desarrollar hemofilia adquirida debido a, por ejemplo:

- i) tratamiento inminente con, por ejemplo penicilina o una sulfonamida
- ii) progreso de un tumor u otra enfermedad maligna
- iii) embarazo inminente o temprano.

La invención será ahora adicionalmente descrita a modo de Ejemplos, los cuales tienen el propósito de servir para ayudar al experto en la técnica a llevar a la práctica la invención y no tienen el propósito de limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Selección de péptido del Factor VIII HLA-DR2

Se compararon una serie de péptido 15meros de FDVIII utilizando tres algoritmos de unión HLA-DR:

SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>)

ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) y

IEDB (<http://www.immuneepitope.org/home.do>).

Se seleccionaron aquellos péptidos que se creía que eran de unión a HLA-DR2 por más de uno de los programas y se diseñaron secuencias flanqueantes para los residuos núcleo pronosticados (tabla 2).

TABLA 2

Péptido No	Primer AA de FVIII	Secuencia en código de aminoácido único	También se hace referencia en la presente como:
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI (SEQ ID NO: 13)	GTLMV (SEQ ID NO: 13)
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD (SEQ ID NO: 2)	TQTLH (SEQ ID NO: 2)
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG (SEQ ID NO: 3)	SLYIS (SEQ ID NO: 3)
4	2161	PPIIARYIRLHPHXY (SEQ ID NO: 4)	PPIIA (SEQ ID NO: 4)
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW (SEQ ID NO: 5)	PPLLT (SEQ ID NO: 5)
6	250	MHTVNGYVNRSPLGL (SEQ ID NO: 6)	MHTVN (SEQ ID NO: 6)
7	322	LGQFLLFCHISSHQH (SEQ ID NO: 7)	LGQFL (SEQ ID NO: 7)
8	478	DTLLIIFKNQASRPY (SEQ ID NO: 8)	DTLLI (SEQ ID NO: 8)
9	545	PRCLTRYYSFVNME (SEQ ID NO: 9)	PRCLT (SEQ ID NO: 9)
10	607	TENIQRFLPNPAGVQ (SEQ ID NO: 10)	TENIQ (SEQ ID NO: 10)
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY (SEQ ID NO: 11)	DNIMV (SEQ ID NO: 11)
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA (SEQ ID NO: 12)	RYLRI (SEQ ID NO: 12)

Ejemplo 2: Investigación de la respuesta de células restringidas HLA-DR2 de ratones inmunizados con factor VIII a péptidos

Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-DR2 con el factor VIII humano en adyuvante. Se extrajeron las células de nódulos linfáticos que drenaron y se re-estimularon *in vitro* con diferentes concentraciones de los 12 péptidos de la tabla 2. Los resultados son mostrados en la Figura 1.

Las células restringidas HLA-DR2 de los ratones inmunizados con factor VIII respondieron claramente fuertemente al péptido DNIMV (SEQ ID NO: 10) (1^{er} aminoácido 1788). También hay respuestas a los péptidos PRCLT (SEQ ID NO: 9) (545) y PPIIA (SEQ ID NO: 4) (2161).

Ejemplo 3: Investigación de la respuesta de linfocitos T de ratones HLA-DR2 a péptidos

Los ratones HLA-DR2 fueron inmunizados, en primer lugar, con factor VIII en adyuvante. Las células del bazo de ratones inmunes fueron re-estimuladas *in vitro* con el factor VIII y los linfoblastos resultantes fueron fusionados con el timoma BW5147 utilizando polietilenglicol.

Los hibridomas de linfocitos T fueron seleccionados en medio HAT y los hibridomas clonados y analizados para determinar su respuesta al factor VIII. Luego, los hibridomas fueron seleccionados para determinar su respuesta a los 12 péptidos pronosticados. De los 27 hibridomas seleccionados, 11 respondieron a DNIMV (SEQ ID NO: 11), 3 a PRCLT (SEQ ID NO: 9) y 3 a PPIIA (SEQ ID NO: 4), si bien la respuesta a PPIIA (SEQ ID NO: 4) fue más débil y menos específica. La respuesta de dos hibridomas específicos para DNIMV (SEQ ID NO: 11) y PRCLT (SEQ ID NO: 9) se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 4 – Investigación de la respuesta de células de nódulos linfáticos de ratones FVIII-DR2+ a péptidos

Se cruzaron ratones transgénicos HLA-DR2 con ratones deficientes en factor VIII para crear un modelo de hemofilia que expresa la molécula de MHV clase II de HLA humana.

Estos animales FVIII-DR2+ fueron inmunizados con factor VIII en adyuvante. Los nódulos linfáticos drenantes fueron aislados y analizados para determinar su respuesta al panel de péptidos. Como se muestra en la Figura 3, estas células respondieron bien a PRCLT (SEQ ID NO: 9) y DNIMV (SEQ ID NO: 11). Hubo una débil respuesta a GTLMV (SEQ ID NO: 13) y una respuesta significativa a RYLRI (SEQ ID NO: 12).

Ejemplo 5 – Investigación de la respuesta de linfocitos T de ratones HLA-DR2 a péptidos

Se inmunizaron ratones deficientes en factor VIII que expresaban HLA-DR2 con factor VIII en adyuvante. Las células de bazo de los ratones inmunizados fueron re-estimuladas *in vitro* con factor VIII y los linfoblastos resultantes fueron fusionados con BW5147, según lo descrito anteriormente. Se seleccionaron hibridomas de linfocitos T para determinar su respuesta a los 12 péptidos pronosticados. Nuevamente, no obstante, la mayoría de los hibridomas respondieron a los péptidos DNIMV (SEQ ID NO: 11) y PRCLT (SEQ ID NO: 9). De los 19 hibridomas específicos para el factor VIII, 10 respondieron a DNIMV (SEQ ID NO: 11), 6 a PRCLT (SEQ ID NO: 9), 1 a PPIIA (SEQ ID NO: 4), 1 a SLYIS (SEQ ID NO: 3) y 1 a DTLLI (SEQ ID NO: 8). Los ejemplos de respuestas por estos hibridomas se muestran en la Figura 4.

En base a estos experimentos, resulta claro que dos péptidos DNIMV (SEQ ID NO: 11) (primer número de aminoácido 1788) y PRCLT (SEQ ID NO: 9) (primer aminoácido 545) constituyen los epítomos de linfocitos T inmunodominantes en la respuesta de linfocitos T restringida a HLA-DR2 a factor humano VIII.

Ejemplo 6 - DNIMV y PRCLT se comportan como apítopos

Para ser un apítopo, un péptido debe ser capaz de unirse a una molécula clase I o II de MHC sin procesamiento posterior de antígenos (es decir recorte ("trimming")) y de ser presentado a un linfocito T. En el presente caso, se investigó la capacidad de los péptidos para ser presentados por APC fijo.

Las células Mgar eran frescas o fijadas con 1% de paraformaldehído. Los clones fueron ensayados para determinar la especificidad antigénica cultivando 100µl de células de hibridoma con 5×10^4 células Mgar en presencia y ausencia de 20µg/ml rhFVIII o epítopos de péptidos durante la noche. Luego, los sobrenadantes fueron recogidos y evaluados para determinar la producción de IL-2 por ELISA. El hecho de que rhFVIII debe ser presentado por células Mgar vivas demuestra que la proteína intacta requiere procesamiento antigénico para ser presentada. Los péptidos DNIMV (SEQ ID NO: 11) y PRCLT (SEQ ID NO: 9), por otro lado, son presentados tanto por células Mgar vivas como fijas lo cual indica que estos péptidos funcionan como apítopos (Figura 5).

Ejemplo 7 – Determinación del rango de epítopos de péptidos capaces de funcionar como apítopos

El rango de epítopos de péptido capaces de funcionar como apítopos en las secuencias que rodean DNIMV (SEQ ID NO: 9), PRCLT (SEQ ID NO: 9) y los otros péptidos se identificó preparando paneles de péptidos superpuestos (mostrados en las páginas 36-37) y screening de éstos utilizando los hibridomas de linfocitos T utilizando el mismo método que el Ejemplo 5 (Figura 7).

Ejemplo 8 - DNIMV y PRCLT inducen tolerancia a proteína de factor VIII entera

Se trataron ratones transgénicos HLA-DR2 con uno de los dos péptidos solubles, o PBS como control, con anterioridad a la inmunización con factor VIII en adyuvante. Los nódulos linfático drenantes se aislaron y las células de re-estimularon *in vitro* con proteína del factor VIII a fin de evaluar el status inmune de los ratones. Como se muestra en la Figura 6, el tratamiento de los ratones con DNIMV (SEQ ID NO: 11) o PRCLT (SEQ ID NO: 9) condujo a una supresión sustancial de la respuesta inmune al factor VIII.

Ejemplo 9 – Investigación de si DNIMV y PRCLT eran capaces de inducir tolerancia en los ratones con inactivación ("knockout") de factor VIII

Se sabe a partir del ejemplo 8 que estos dos péptidos son capaces de prevenir la respuesta inmune al factor VIII en ratones que expresan el factor VIII endógeno. El

experimento fue repetido con animales FVIII-DR2+ para determinar si estos péptidos también previenen la respuesta inmune al factor VIII en ratones deficientes en factor VIII.

Ejemplo 10 – Investigación de si DNIMV y PRCLT en combinación son capaces de inducir tolerancia en los ratones con desactivación (“knockout”) del factor VIII

Los dos péptidos los cuales se ha demostrado que reducen individualmente la respuesta inmune a factor VIII en ratones deficientes en factor VIII en el Ejemplo 9 se combinaron. Como se muestra en la Figura 8, el tratamiento de los ratones con DNIMV (SEQ ID NO: 11) y PRCLT (SEQ ID NO: 9) condujo a una supresión sustancial de la respuesta inmune al factor VIII, como se muestra por la disminución en la producción de IFN-gamma. IFN-gamma es la clase principal de linfoquina de reordenamiento (“switch lymphokine”) requerida para neutralizar anticuerpos en el ratón. El efecto demostrado fue superior al observado utilizando cualquiera de los dos péptido por sí solo.

Ejemplo 11: La inducción de tolerancia utilizado un péptido modificado

El péptido DNIMV (SEQ ID NO: 11) es en parte, pero no completamente soluble. A fin de mejorar la solubilidad del péptido, se diseñó una versión modificada con la siguiente secuencia: EDNIMVTFRNQASR (SEQ ID NO: 23).

Este es extendido en el término N para agregar un residuo hidrófilo cargado. Es también truncado en el término C para eliminar los residuos prolina y tirosina. Por añadidura, colocando aminoácidos cargados positiva y negativamente en cualquiera de los dos extremos del péptido, se crea un dipolo de carga que se ha informado que aumenta la solubilidad.

El péptido modificado es más soluble que DNIMV (SEQ ID NO: 11) y suficientemente soluble para permitir la administración del péptido intranasal. A fin de evaluar la inducción de tolerancia utilizando este epítipo peptídico, se tomaron ratones deficientes en FVIII y a la mitad de ellos se los trató con el péptido EDNIMV (SEQ ID NO: 23) modificado (denominado “tolerizado” en la figura 9). Luego, los ratones fueron inmunizados con DNIMV (SEQ ID NO: 11) en CFA y 10 días más tarde se recolectaron nódulos linfáticos drenantes y se estimularon *in vitro* con DNIMV (SEQ ID NO: 11) o EDNIMV (SEQ ID NO: 23). La Figura 9 muestra los resultados para las respuestas de ratones sin tratamiento o tolerizados estimulados con DNIMV (SEQ ID NO: 11) o EDNIMV (SEQ ID NO: 23) *in vitro*.

Los resultados demuestran que EDNIMV (SEQ ID NO: 23) es capaz de recordar una respuesta inmune de ratones inmunizados con DNIMV (SEQ ID NO: 11).

Adicionalmente, demuestran muy claramente que los ratones tolerizados con EDNIMV (SEQ ID NO: 23) no pueden montar una respuesta inmune a DNIMV (SEQ ID NO: 11) *in vivo* según lo revelado por la falta de respuesta a DNIMV (SEQ ID NO: 11) o EDNIMV (SEQ ID NO: 23) *in vitro* después del cebado ("priming") con DNIMV (SEQ ID NO: 11) en CFA.

Ejemplo 12: EDNIMV induce tolerancia a la proteína del factor VIII entera

El experimento descrito en el Ejemplo 8 es repetido para el péptido modificado EDNIMV (SEQ ID NO: 23) para demostrar que EDNIMV (SEQ ID NO: 23) es capaz de suprimir la respuesta inmune a la proteína del factor VIII entera.

Métodos

(i) Respuestas de memoria para ratones DR2+ cebados con rhFVIII

Ratones null clase II MHC murinos HLA-DR2+ fueron inmunizados con 40µg rhFVIII emulsionado en Adyuvante de Freund Completo (Complete Freund's Adjuvant) suplementado con 400µg de *H37Ra* de *M.tuberculosis* eliminado por calor ("heat-killed"), subcutáneamente en la base de la cola. 10 Días después los ratones fueron sacrificados y se eliminaron los nódulos linfáticos drenantes. Las suspensiones de célula única se prepararon y los linfocitos se incubaron a $4-5 \times 10^5$ células por pocillo en placas con fondo plano de 96 pocillos durante 72 horas con las concentraciones indicadas de péptido o antígenos control antes de pulsación con 0,5µCi/pocillo de timidina tritiada durante otras 16 horas. Luego, las placas se congelaron antes de que las células fueran recolectadas sobre esteras filtrantes de vidrio e incorporación radiactiva medida utilizando un contador beta de centelleo líquido

(ii) Especificidad de péptido de FVIII de hibridoma de linfocitos T generados a partir de ratones DR2+

Se inmunizaron ratones "null" clase II de MHC murino HLA-DR2+ como se describió con anterioridad. En el día 10, los nódulos linfáticos drenantes fueron eliminados y los linfocitos cultivados a $2,5 \times 10^6$ células/ml, 1ml/pocillo en placas de 24 pocillos en presencia de 20µg/ml rhFVIII durante 3 días. Luego de esta estimulación, los linfocitos fueron recuperados, lavados y fusionados con células socias de fusión BW TCRαβ BW en una relación de 4 células BW a 1 linfocito, utilizando polietilenglicol según lo descrito por Nelson et al (1980) *PNAS* **77**(5):2866. Las células fusionadas fueron cuidadosamente lavadas y luego se colocaron en placas de 96 pocillos con fondo plano durante 2 días antes de la adición de medio HAT para seleccionar para hibridomas de linfocitos T. Las células fueron monitoreadas para crecimiento y luego de aproximadamente 10 días de haberse realizaron las fusiones, se seleccionaron clones individuales y se transfirieron a

placas de 24 pocillos en medio HAT. Los clones se mantuvieron en medio HAT durante por lo menos 2 semanas antes de ser separados en medio HT y luego medio completo. Los clones fueron analizados para determinar la especificidad antigénica cultivando 100µl de células de hibridoma con 5×10^4 células Mgar en presencia y ausencia de 20µg/ml rhFVIII durante toda la noche. Luego, los sobrenadantes fueron recolectados y evaluados para producción de IL-2 mediante ELISA, produciendo los clones IL-2 como respuesta a rhFVIII considerándose positivos para especificidad para FVIII. Para investigar el repertorio de péptidos de FVIII pronosticados, los clones específicos para FVIII fueron nuevamente analizados para determinar la producción de IL-2, luego de incubación durante toda la noche con 20µg/ml de cada uno de los 12 péptidos.

(iii) Respuestas de memoria para ratones FVIII-/- cebados con rhFVIII

Se siguió el mismo método que para (i), excepto que los ratones eran deficientes en FVIII, HLA-DR2+ y "null" clase II MHC murino.

(iv) Especificidad de péptido de FVIII de hibridomas de linfocitos T generados de ratones FVIII-/-

Se siguió el mismo método que para (ii), excepto que los ratones eran deficientes en FVIII y HLA-DR2+.

(v) Tolerización de respuestas específicas para FVIII en ratones DR2+ mediante pretratamiento con péptidos de FVIII inmunodominantes

Se trataron ratones "null" clase II de MHC murinas HLA-DR2+ 3 veces con 100µg de DNIMV (SEQ ID NO: 11), PRCLT (SEQ ID NO: 9) o PPIIA (SEQ ID NO: 4) disuelto en PBS, o el volumen equivalente de PBS por sí sola. Se administraron péptidos intraperitonealmente, con 3-4 días entre cada dosis. Luego de la administración final, los ratones fueron cebados con rhFVIII emulsionado en adyuvante de Freund completo como para (i). 10 Días más tarde, los nódulos linfáticos drenantes fueron recuperados y los linfocitos fueron posteriormente cultivados in vitro con rhFVIII, o cada uno de los péptidos tolerizantes así como también antígenos control, durante 72 horas antes de la adición de timidina tritiada como para (i).

(vi) Tolerización de respuestas específicas para FVIII en ratones DR2+ mediante pretratamiento con una combinación de péptidos de FVIII inmunodominantes

Se trataron ratones "null" clase II de MHC murinas HLA-DR2+ 3 veces con DNIMV (SEQ ID NO: 11), PRCLT (SEQ ID NO: 9) o con una combinación de DNIMV (SEQ ID NO: 11) y PRCLT (SEQ ID NO: 9) disueltos en PBS, o el volumen equivalente de PBS por sí solas. Los péptidos fueron administrados intraperitonealmente, durante 8 días. Luego de la administración final, los ratones fueron cebados con rhFVIII emulsionado en adyuvante

completo de Freund como para (i). 10 días más tarde, los nódulos linfáticos drenantes fueron recuperados y los linfocitos posteriormente re-estimulados *in vitro* con rhFVIII. A continuación, los sobrenadantes fueron recolectados y se midió IFN-gamma.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva que antecede son incorporadas a la presente a modo de referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos descritos y sistema de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Si bien la invención ha sido descrita con relación a realizaciones preferidas específicas, debería entenderse que la invención según se reivindica no debería estar indebidamente limitada a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención las cuales son obvias para aquellos expertos en inmunología molecular o campos relacionados tienen el propósito de encontrarse dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

SEC ID No.1

1 mqielfstcfl lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdI gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvykktlf veftdhlfni akprppwmgI lgptiqaevy dtvvtlknm ashpvsIhav
 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
 181 vdlvkdlngs ligallvcre gslakektqt lkhkfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
 241 aasarawpkm htvngyvnrS lpgligchrk svywhvigmg tpevhSifl eghtflvrnh
 301 rqaSleispi tfltaqtllm dlqgflfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlrmknne
 361 eaedydddl tsemdvvrfd ddnspsfiqi rsvakkhpkt wwhyiaaeS dwdyaplvla
 421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdetftrea iqhesgilgp llygevgdtl
 481 liifknqasr pyniypgfit dvrplysrri pkgvkhkdf pilpgeifky kwtvtvedgp
 541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde
 601 nrswylteni qrlfpnpagv qldepefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
 661 igaqtdflsv ffgytflkhk mvyedtlitf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrnrg
 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknnaieprs fsqnsrhpst rqkqfnatti
 781 pendiektdp wfahrtmpk iqnvsssdll mlrqstph glslsdlqea kyetfsddps
 841 pgaidsnnsI semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrlne klgttaatel kklfdkvsst
 901 snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmvp hydsqldtl fggkssplte sggplslsee
 961 nndsklesg lmnseqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefk vtplihdrml mdknatalrl
 1081 nhmsnktts knmemvqqk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknsInsg
 1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nflseknkv vgkgeftkdv glkemvfpss nrlfltnldn
 1201 lhennthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknlfis trqnvegsyd
 1261 gayapvlqdf rslndstnr kkhtahfskk geeenlegl nqtqiveky acttrispnt
 1321 sqqnfvtrs kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
 1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrslpia kvssfpsirp iyltrvlfd nsshlpaaSy
 1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nslailtle mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvp
 1501 kpdipktsgk vellpkvhiy qkdlftets ngspghldlv egslqgteg aikwneanrp
 1561 gkvplrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
 1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnpp vlkrhqreit rttlqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkkrhyfia averlwdygm sssphvlrnr
 1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtfrnqasr
 1801 pysfyslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhsgl igpllchtn tlnpahgrqv tvqefalft ifdetkswyf tenmerncra
 1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsihfsgH
 1981 vftvrkkeey kmalynlypg vfetvemlps kagiwrvecl igehlhagms tflvysnkc
 2041 qtplgmasgh irdfqitasg qygqwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdlIapmii

2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvtqgvksl ltsmyvkefl
2281 isssqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvvnsldppl ltrylrihpq swvhqialrm
2341 evlgceaqdl y

Paneles de péptidos superpuestos preparados en el Ejemplo 7

Conjunto superpuesto para DTLLIIFKNQASRPY

1.	473-488	YGEVGD	TLLIIFKNQ
2.	474-489	GEVGD	TLLIIFKNQA
3.	475-490	EVGD	TLLIIFKNQAS
4.	476-491	VGD	TLLIIFKNQASR
5.	477-492	GD	TLLIIFKNQASRP
6.	478-493	DTLLIIFKNQASRPY	
7.	479-494	TLLIIFKNQASRPYN	
8.	480-495	LLIIFKNQASRPYNI	
9.	481-496	LIIFKNQASRPYNIY	
10.	482-497	IIFKNQASRPYNIYP	
11.	483-498	IFKNQASRPYNIYPH	

Conjunto superpuesto para PRCLTRYSSFVNME

1.	540-554	PTKSD	PRCLTRYSS
2.	541-555	TKSD	PRCLTRYSSSF
3.	542-556	KSD	PRCLTRYSSSFV
4.	543-557	SD	PRCLTRYSSSFVN
5.	544-558	D	PRCLTRYSSSFVNM
6.	545-559	PRCLTRYSSSFVNME	
7.	546-560	RCLTRYSSSFVNMER	
8.	547-561	CLTRYSSSFVNMERD	
9.	548-562	LTRYSSSFVNMERDL	
10.	549-563	TRYSSSFVNMERDLA	
11.	550-564	RYSSSFVNMERDLAS	

Conjunto superpuesto para DNIMVTFRNQASRPY

1. 1783-1797	RAEVEDNIMVTFRNQ
2. 1784-1798	AEVEDNIMVTFRNQA
3. 1785-1799	EVEDNIMVTFRNQAS
4. 1786-1800	VEDNIMVTFRNQASR
5. 1787-1801	EDNIMVTFRNQASRP
6. 1788-1802	DNIMVTFRNQASRPY
7. 1789-1803	NIMVTFRNQASRPYS
8. 1790-1804	IMVTFRNQASRPYSF
9. 1791-1805	MVTFRNQASRPYSFY
10. 1792-1806	VTFRNQASRPYSFYS
11. 1793-1807	TFRNQASRPYSFYSS

Conjunto superpuesto para SLYISQFIIMYSLDG

1. 2109-2123	RQKFSSLYISQFIIM
2. 2110-2124	QKFSSLYISQFIIMY
3. 2111-2125	KFSSLYISQFIIMYS
4. 2112-2126	FSSLYISQFIIMYSL
5. 2113-2127	SSLYISQFIIMYSLD
6. 2114-2128	SLYISQFIIMYSLDG
7. 2115-2129	LYISQFIIMYSLDGK
8. 2116-2130	YISQFIIMYSLDGKK
9. 2117-2131	ISQFIIMYSLDGKKW
10. 2118-2132	SQFIIMYSLDGKKWQ
11. 2119-2133	QFIIMYSLDGKKWQT

Conjunto superpuesto para PPIIARYIRLHPTHY

1. 2156-2170	HNIFNPPIIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPIIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPIIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIIARYIRLHPT

5. 2160-2174	NPPIIARYIRLHPTH
6. 2161-2175	PPIIARYIRLHPTHY
7. 2162-2176	PIIARYIRLHPTHYS
8. 2163-2177	IIARYIRLHPTHYSI
9. 2164-2178	IARYIRLHPTHYSIR
10. 2165-2179	ARYIRLHPTHYSIRS
11. 2166-2180	RYIRLHPTHYSIRST

Conjunto superpuesto para RYLRIHPQSWVHQIA

1. 2317-2331	PPLLTRYLRIHPQSW
2. 2318-2332	PLLTRYLRIHPQSWV
3. 2319-2333	LLTRYLRIHPQSWVH
4. 2320-2334	LTRYLRIHPQSWVHQ
5. 2321-2335	TRYLRIHPQSWVHQI
6. 2322-2336	RYLRIHPQSWVHQIA
7. 2323-2337	YLRIHPQSWVHQIAL
8. 2324-2338	LRIHPQSWVHQIALR
9. 2325-2339	RIHPQSWVHQIALRM
10. 2326-2340	IHPQSWVHQIALRME
11. 2327-2341	HPQSWVHQIALRMEV

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Apitope Technology (Bristol) Limited

<120> PÉPTIDO

<130> P036475CL

<140> PCT/GB2010/000997

<141> 17-05-2010

<150> GB 0908515.0

<151> 18-05-2009

<160> 83

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45

43

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
915 920 925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
930 935 940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
980 985 990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
995 1000 1005

Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser
1010 1015 1020

Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser
1025 1030 1035

Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu
1040 1045 1050

Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg
 1055 1060 1065

Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met
 1070 1075 1080

Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln
 1085 1090 1095

Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met
 1100 1105 1110

Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile
 1115 1120 1125

Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro
 1130 1135 1140

Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu
 1145 1150 1155

Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys
 1160 1165 1170

Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro
 1175 1180 1185

Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu
 1190 1195 1200

Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu
 1205 1210 1215

Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile
 1220 1225 1230

His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu
 1235 1240 1245

Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1250 1255 1260

Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn
 1265 1270 1275

Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu
 1280 1285 1290

Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu
 1295 1300 1305

Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln
 1310 1315 1320

Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg
 1325 1330 1335

Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp
 1340 1345 1350

Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro
 1355 1360 1365

Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala
 1370 1375 1380

Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser
 1385 1390 1395

Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser
 1400 1405 1410

Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe
 1415 1420 1425

Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys
 1430 1435 1440

Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys
 1445 1450 1455

Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly
 1460 1465 1470

Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser
 1475 1480 1485

Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp
 1490 1495 1500

Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His
 1505 1510 1515

Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser
 1520 1525 1530

Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr
 1535 1540 1545

Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val
 1550 1555 1560

Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser
 1565 1570 1575

Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln
 1580 1585 1590

Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys
1595 1600 1605

Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys
1610 1615 1620

Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys
1625 1630 1635

Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
1640 1645 1650

Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu
1655 1660 1665

Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
1670 1675 1680

Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile
1685 1690 1695

Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
1700 1705 1710

Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
1715 1720 1725

Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
1730 1735 1740

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
1745 1750 1755

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu
1760 1765 1770

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
1775 1780 1785

Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1790 1795 1800

Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
1805 1810 1815

Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
1820 1825 1830

Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
1835 1840 1845

Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
1850 1855 1860

Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
 1865 1870 1875

Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 1880 1885 1890

Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
 1895 1900 1905

Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1910 1915 1920

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 1925 1930 1935

Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
 1940 1945 1950

Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1955 1960 1965

Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
 1970 1975 1980

Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
 1985 1990 1995

Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
 2000 2005 2010

Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
 2015 2020 2025

Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
 2030 2035 2040

Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 2045 2050 2055

Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
 2060 2065 2070

Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
 2075 2080 2085

Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
 2090 2095 2100

Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 2105 2110 2115

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 2120 2125 2130

Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 2135 2140 2145

Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2150 2155 2160

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 2165 2170 2175

Ser Thr Leu Arg Met Glu Trp Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
 2180 2185 2190

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
 2210 2215 2220

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
 2225 2230 2235

Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
 2240 2245 2250

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
 2255 2260 2265

Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
2270 2275 2280

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
2285 2290 2295

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
2300 2305 2310

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
2315 2320 2325

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
2330 2335 2340

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
2345 2350

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
1 5 10 15

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
1 5 10 15

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu

1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
1 5 10 15

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1 5

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófilo cargado

<400> 21

Xaa Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 14
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un aminoácido cargado con polaridad inversa a Xaa en posición 14

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa es un aminoácido cargado con polaridad inversa a Xaa en posición 1

<400> 22

Xaa Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Xaa
1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
1 5 10

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
1 5 10 15

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
1 5 10 15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe
1 5 10 15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
1 5 10 15

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met
1 5 10 15

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp
1 5 10 15

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu
1 5 10 15

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
1 5 10 15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 44
<211> 15
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
1 5 10 15

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe
1 5 10 15

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr
1 5 10 15

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1 5 10 15

<210> 54
<211> 15
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
1 5 10 15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu
1 5 10 15

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys
1 5 10 15

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys
1 5 10 15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
1 5 10 15

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln
1 5 10 15

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
1 5 10 15

<210> 64

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
1 5 10 15

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His
1 5 10 15

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1 5 10 15

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr
1 5 10 15

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His
1 5 10 15

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile

1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr
1 5 10 15

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu
1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
1 5 10 15

<210> 81
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met
1 5 10 15

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu
1 5 10 15

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia EDNIMVTFRNQASR (SEQ ID NO: 23).
2. Una composición que comprende una pluralidad de péptidos, incluyendo uno o más péptidos de acuerdo con la reivindicación 1.

RESUMEN
PÉPTIDO FVIII ÚTIL PARA SUPRIMIR O PREVENIR LA PRODUCCIÓN DE
ANTICUERPOS INHIBIDORES DE FVIII

La presente invención proporciona péptidos por lo menos parcialmente derivables de FVIII los cuales son capaces de unirse a una molécula clase II de MHC sin procesamiento posterior de antígenos y de ser reconocidos por un linfocito T específico para el factor VIII. En particular, la presente invención provee un péptido que comprende o consiste en la secuencia EDNIMVTFRNQASR. La presente invención se refiere además al uso de dicho péptido para la prevención o supresión de la formación de anticuerpos inhibidores en la hemofilia A y/o en la hemofilia adquirida.