



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156774-00000-0000

Fecha: 2011-11-17 14:35:39
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 143

PROPIEDAD INDUSTRIAL

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: PÉPTIDO

CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 38/37

71. SOLICITANTE: APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED

DOMICILIO: University Gate East Park, Row Bristol BS1
5UB, Reino Unido

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., _____

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED**

Dirección: **University Gate East Park
Row Bristol BS1 5UB, Reino Unido**

Nacionalidad o Domicilio: **Row Bristol
Reino Unido**

Lugar de Constitución: **Reino Unido**

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número Cual

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**

Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**

Teléfono: **756 0770** Fax: **755 0158**

E-mail: **info@castellanosyco.com**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐
Cual

Número **39'779.654** TPA **70.819**

④

INVENTOR (ES) (72)

WRAITH, David
Apitope technology (Bristol) limited,
University Gate East Park
Row Bristol BS1 5UB, Reino Unido

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/GB2010/000997**

Fecha **17/05/2010**

Publicación Internacional No. **WO 2010/133834 A2**

Fecha **25/11/2010**

⑥

Título (54) **PÉPTIDO**

⑦

Clasificación Internacional (51) **A61K 38/37**

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB

18/05/2009

0908515,0

⑨

Comprobante de pago No. **11-110185 y 11-112177**

Fecha **noviembre 10 y 17 de 2011**

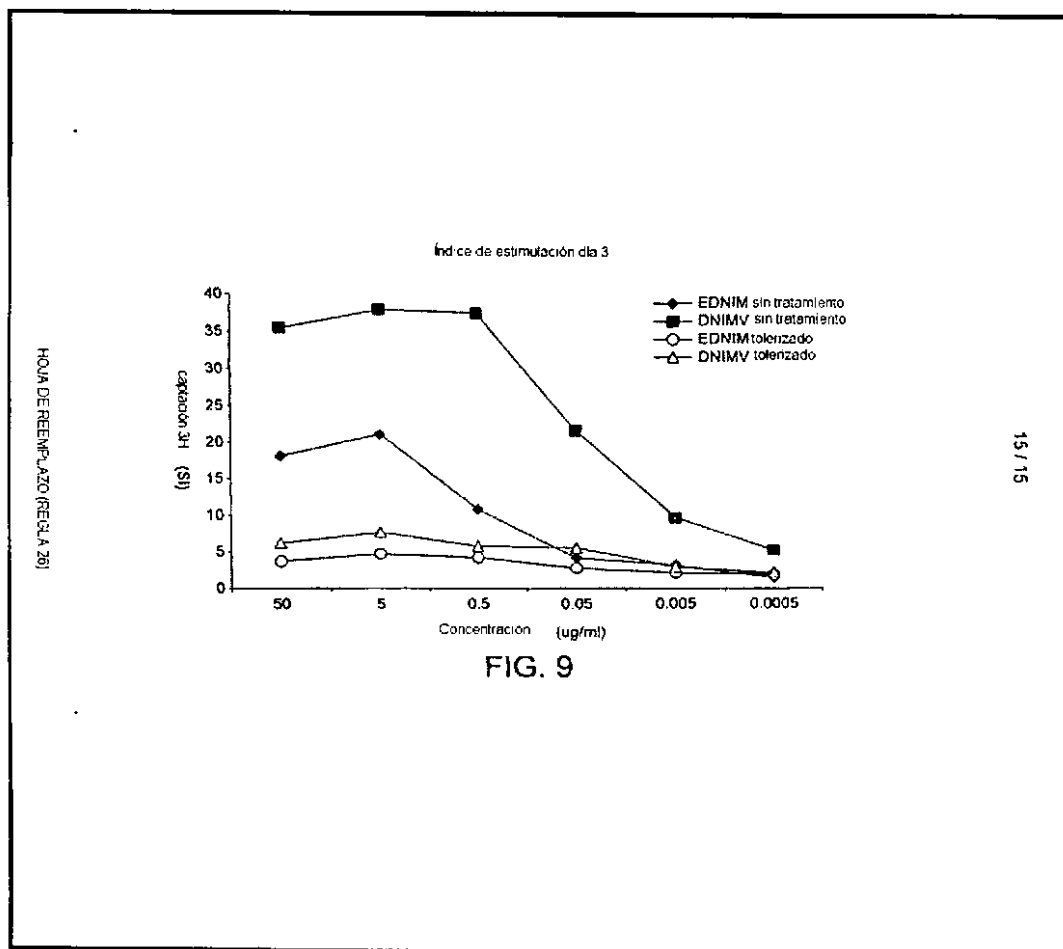
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

000000

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. 39'79.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

17 NOV. 2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página. - MCA/kb - P2348

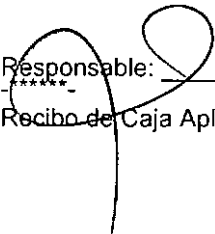
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 110185
		Bogotá D.C., Noviembre 10 de 2011 - 14:41:19

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO	NI 800.174.641
----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383921145	10/11/2011	13.478.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00
		=====	

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156774- -00000-0000

Fecha: 2011-11-17 14:35:39	Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII	Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION	Folios: 143

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 November 2010 (25.11.2010)

PCT

(10) International Publication Number

WO 2010/133834 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 38/37 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/GB2010/000997(22) International Filing Date:
17 May 2010 (17.05.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0908515.0 18 May 2009 (18.05.2009) GB(71) Applicant (for all designated States except US): API-
TOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED
[GB/GB]; University Gate East, Park Row, Bristol BS1
5UB (GB).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): WRAITH, David
[GB/GB]; Apitope Technology (Bristol) Limited, Univer-
sity Gate East, Park Row; Bristol BS1 5UB (GB).(74) Agent: HOLLIDAY, Louise, Caroline; D Young & Co
LLP, 120 Holborn, London EC1N 2DY (GB).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2010/133834 A2

(54) Title: PEPTIDE

(57) Abstract: The present invention provides peptides at least partly derivable from FVIII which are capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell. In particular, the present invention provides a peptide comprising or consisting of the sequence EDNIMVTFRNQASR. The present invention also relates to the use of such a peptide for the prevention or suppression of inhibitor antibody formation in haemophilia A and/or acquired haemophilia.

PEPTIDE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a peptide. In particular, it relates to peptides at least the core sequence of which is derivable from factor VIII (FVIII). The peptides can be used to reduce or prevent factor VIII inhibitor antibody formation, for example in haemophilia A treatment and acquired haemophilia.

BACKGROUND TO THE INVENTION

HAEMOPHILIA

Haemophilia belongs to a group of inheritable blood disorders that includes haemophilia A, haemophilia B (Christmas disease) and Von Willebrand's disease.

In haemophilia, the blood's ability to clot is severely reduced because an essential clotting factor is partly or completely missing, resulting in increased bleeding time.

Haemophilia A is a deficiency of the clotting factor VIII, whereas Haemophilia B is a deficiency of clotting factor IX. In both diseases, the faulty gene is found on the X chromosome, so the conditions are X-linked. Haemophilia A is five times more common than haemophilia B.

Haemophilia is a lifelong inherited genetic condition, which affects females as carriers and males who inherit the condition. About a third of new diagnoses are where there is no previous family history. It appears world-wide and occurs in all racial groups. About 6,000 people are affected with haemophilia in the UK.

Haemophiliacs bleed for a prolonged period following injury. External injuries such as cuts and grazes do not usually pose serious problems: it is often possible to stop bleeding by applying a degree of pressure and covering the affected area (e.g. with a plaster).

The main problem is internal bleeding into joints, muscles and soft tissues, which can occur spontaneously. Internal bleeding, such as haemorrhages into the brain, is very difficult to manage and can be fatal. Repeated bleeding in the joints causes acute pain and can cause arthritis and/or long-term joint damage leading to disability.

Treatment for haemophilia is usually by replacement of the missing clotting factor. In mild or moderate haemophilia injections may be given at the time a bleed occurs (on-demand therapy). However, in severe haemophilia regular prophylactic injections are given to help the blood to clot and minimise the likelihood of long term joint damage.

A potentially serious complication of coagulation factor replacement therapy for haemophilia A is the development of antibodies that neutralise the procoagulant function of factor VIII. Factor VIII inhibitors occur in approximately 25% of those with severe haemophilia A. Since patients with congenital haemophilia A can be genetically deficient in FVIII, the synthesis of inhibitors is an alloimmune response to the foreign protein administered to prevent or treat bleeding episodes.

CD4+ T cells play a central role in the immune response to FVIII. After being taken up by antigen-presenting cells (APCs), FVIII undergoes proteolytic degradation into peptide fragments (Reding *et al* (2006) Haemophilia 12(supp 6) 30-36). These peptides are then presented on the surface of the APC in association with MHC class II molecules. This complex is then recognised by the T cell receptor of a CD4+ cell specific for FVIII. In the presence of the appropriate costimulatory signals, this recognition ultimately causes the CD4+ cell to direct the synthesis of antibodies by B cells.

The incidence of inhibitor formation initially increases with the number of factor VIII treatments, but appears to plateau after 50-100 exposure days. Inhibitor formation is much more common in severe haemophilia than in moderate or mild disease and some molecular defects, most clearly large deletions and nonsense mutations in the factor VIII light chain, appear to predispose to inhibitor formation. Parameters such as the concentration, type (purified or recombinant) of replacement factor, and treatment history may also affect the likelihood of antibody production.

The management of haemophilia patients with inhibitors is an ongoing challenge. Immune tolerance induction (ITI) using a desensitization technique is successful in some patients with alloantibodies against factor VIII. This therapeutic approach requires ongoing exposure to factor replacement therapy, so is a long-term strategy.

Although ITI can be successful, a significant proportion (about 30%) of patients fail to respond to ITI. Patients with high inhibitor titres are much less likely to respond to treatment. Another significant contributing factor is age at the start of commencing ITI, with greatly decreased success rates when the patient is older than 20 (Hay *et al* (2005) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32:15-21)

When ITI therapy is unsuccessful, the inhibitor generally persists for life, and because such patients are usually high-responders, it is necessary to treat episodes of bleeding with FVIII bypassing products, such as activated prothombin complex concentrates (FEIBATM), and recombinant-activated FVII. However, the use of such agents is associated with adverse events such as disseminated intravascular coagulation, acute myocardial infarction, pulmonary embolus and thromboses (Acharya and DiMichele (2006) *Best Practice & Research Clinical Haematology* 19:51-66).

Immunosuppressive therapy is sometimes used for patients who fail to response to ITI. Treatment includes administration of immunosuppressive drugs such as cyclophosphamide, prednisone, azathioprine and cyclosporine which non-specifically target the immune system. These treatments can have side-effects associated with general immunosuppression.

There is renewed interest on selective B cell depletion using RituximabTM, a humanised monoclonal antibody to B cell CD20 antigen. However, infusion reactions, serum sickness and opportunistic infections have occurred in some children treated with this drug (DiMichele (2007) *J Thromb Haemost* 5:143-50).

ACQUIRED HAEMOPHILIA

Acquired haemophilia is a rare autoimmune condition which affects between 1 and 4 people in every million. In this condition, subjects who are not born with haemophilia

develop antibodies against one of the clotting factors such as factor VIII. It is thought that pregnancy and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and cancer may increase the risk of developing acquired haemophilia. Although there are differences in the underlying immune mechanisms leading to their production, the clinical manifestations of FVIII inhibitors produced in response to coagulation factor replacement therapy and those produced in acquired haemophilia are similar.

Acquired haemophiliac patients have a mortality rate that approaches 25%, partly because of the association of acquired inhibitors with severe bleeding complications. The therapy of acquired autoantibody inhibitors is based primarily on the need to control or prevent acute hemorrhagic complications, which frequently are life and limb threatening and secondarily to eradicate the autoantibody to restore normal coagulation.

Some bleeds associated with low titre autoantibody inhibitors (< 5 Bethesda Units) may be treated effectively with FVIII concentrates administered at high doses. Porcine FVIII concentrate was formerly considered a critical first-line therapy for acquired hemophilia-related bleeding since it was the only replacement therapy that provided an opportunity to actually measure post-infusion FVIII coagulation activity levels in the laboratory. The product was removed from the marketplace in 2004 because of contamination of the porcine plasma pools by porcine parvovirus. Now, "bypassing" agents are most commonly used, but potential risks of thrombogenicity exist and there is only about 80% efficacy for each product. Plasma exchange via plasmapheresis and extracorporeal immunoadsorption may be necessary to temporarily reduce the inhibitor titer enough for bypassing agents or FVIII replacement to provide adequate hemostasis.

Eradication of autoantibody inhibitors depends on immunosuppressive measures, such as: (1) administration of corticosteroids with 30%–50% efficacy in 3–6 weeks; (2) use of cytotoxic and myelosuppressive chemotherapeutic agents, e.g., cyclophosphamide, cyclosporine, 2-chlorodeoxyadenosine; (3) immunomodulation with intravenous immunoglobulin; and (4) selective B-lymphocyte depletion with rituximab. RituximabTM responders may require concurrent use of steroids and relapses may respond to retreatment.

Thus, all currently available methods for reducing autoantibody production associated with haemophilia A treatment, and autoantibody production in acquired haemophilia,

have shortcomings. There is therefore a need for improved methods to address the issue of anti-FVIII antibodies in haemophilia A and acquired haemophilia.

The present inventors have found that it is possible to prevent FVIII inhibitor antibody formation by pre-tolerising the patient with FVIII-derived peptides.

SUMMARY OF ASPECTS OF THE INVENTION

The first aspect of the present invention, therefore, relates to a peptide, at least part of the sequence of which is derivable from FVIII, which is capable of inducing or restoring tolerance to FVIII.

In a first embodiment, the present invention provides a peptide comprising one of the following FVIII-derived sequences:

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRHPQSWVHQIA

with one or more of the following modifications:

- (i) removal of one or more hydrophobic amino acid(s);
- (ii) replacement of one or more hydrophobic amino acid(s) with charged hydrophilic amino acid(s); and
- (iii) insertion of a charged amino acid at one or both terminus(i)

which modified peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

The "parent" (unmodified) peptide may be PRCLTRYYSFVNME or DNIMVTFRNQASRPY

In a second embodiment the present invention provides a peptide comprising the sequence

$X(aa)_n$ -core sequence $-(aa)_m$

wherein X is a charged hydrophilic residue;

aa is an amino acid;

n is an integer between 0 and 5;

m is an integer between 0 and 5; and

the "core sequence" is selected from the following group of FVIII-derived

peptides: LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

which peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

For example, the peptide may comprise the sequence

XDNIMVTFRNQAS.

In a third embodiment, the present invention provides a peptide comprising the sequence:

$Y(aa)_n$ -core sequence $-(aa)_mZ$

wherein Y and Z are charged amino acids having reverse polarity;

aa is an amino acid;

n is an integer between 0 and 5;

m is an integer between 0 and 5; and

the "core sequence" is selected from the following group of FVIII-derived peptides:

LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

which peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

For example, the peptide may comprise the sequence:

YDNIMVTFRNQASZ

In the third embodiment, for example, Y may be a positively charged amino acid and Z may be a negatively charged amino acid. Alternatively, Y may be a negatively charged amino acid and Z may be a positively charged amino acid.

A charged, hydrophilic amino acid may, for example be D, E, K, H or R. A positively charged amino acid may, for example be K, H or R. A negatively charged amino acid may, for example be D or E.

The peptide of the first aspect of the invention may, for example, comprise or consist of the sequence EDNIMVTFRNQASR.

In a second aspect, the present invention provides a composition, such as a pharmaceutical composition comprising one or more peptide(s) of the first aspect of the invention. The composition may comprise a plurality of peptides wholly or partly derivable from FVIII which are capable of inducing or restoring tolerance to FVIII.

The composition may be in the form of a kit, in which the plurality of peptides are provided separately for separate, subsequent, sequential or simultaneous administration.

The peptide or a composition of the invention may be for use in suppressing, reducing, or preventing the development of factor VIII inhibitor antibodies.

The present invention also provides the use of such a peptide or composition in the manufacture of a medicament to suppress, reduce or prevent the development of factor VIII inhibitor antibodies.

The present invention also provides a method for suppressing, preventing or reducing the development of Factor VIII inhibitor antibodies in a subject, which comprises the step of administration of such a peptide or composition to the subject.

The subject may be deficient in FVIII. In particular the subject may have haemophilia A, and may be, or be about to, undergo factor VIII replacement therapy.

Alternatively the subject may have, or be at risk from contracting, acquired haemophilia.

Factor VIII inhibitors are found more frequently in individuals expressing HLA-DR2. The subject treated by the method of the invention may therefore be HLA-DR2 positive.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1: Recall responses for lymph node cells (LNC) from FVIII+DR2+ mice primed with rhFVIII/CFA

- a) LNC proliferation to FVIII peptides 1-6
- b) LNC proliferation to FVIII peptides 7-12
- c) LNC proliferation to FVIII peptides 1, 3 and 11

Figure 2: Representative examples of FVIII+DR2+ T cell hybridoma clones specific for FVIII-derived peptides

Figure 3: Recall responses for LNC from FVIII-DR2+ mice primed with rhFVIII/CFA

Figure 4: Representative examples of FVIII-DR2+ T cell hybridoma clones specific for FVIII-derived peptides

Figure 5: FVIII-/- clones specific for a) DNIMV and b) PRCLT

Figure 6: Recall responses for LNC to FVIII for FVIII+DR2+ mice treated 3x i.p. with peptide prior to priming with rhFVIII/CFA.

Figure 7: Determination of the range of peptide epitopes capable of functions as apitopes using FVIII-DR2+ T cell hydridoma clones specific for FVIII-derived overlapping peptides. The original peptide is termed 0. One amino acid shift towards the N-terminal is -1, two amino acid shifts towards the N-terminal is -2 etc. One shift towards the C-terminal is +1 etc.

Figure 8: Lymph node cell IFN-gamma production in response to FVIII for FVIII-DR2+ mice treated with FVIII-derived peptides PRCLT, DNIMV or a mixture of both of these.

Figure 9: Responses from naive or tolerised mice stimulated with either EDNIMVTFRNQASR (EDNIMV) or a control peptide (DNIMV).

DETAILED DESCRIPTION

PEPTIDE

The present invention relates to a peptide.

The term "peptide" is used in the normal sense to mean a series of residues, typically L-amino acids, connected one to the other typically by peptide bonds between the α -amino and carboxyl groups of adjacent amino acids. The term includes modified peptides and synthetic peptide analogues.

The peptide of the present invention may be made using chemical methods (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.). For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). Automated synthesis may

be achieved, for example, using the ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer.

The peptide may alternatively be made by recombinant means, or by cleavage of a peptide from factor VIII followed by modification of one or both ends. The composition of a peptide may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure).

For practical purposes, there are various other characteristics which the peptide may show. For example, it is important that the peptide is sufficiently stable *in vivo* to be therapeutically useful. The half-life of the peptide *in vivo* may be at least 10 minutes, 30 minutes, 4 hours, or 24 hours.

The peptide may also demonstrate good bioavailability *in vivo*. The peptide may maintain a conformation *in vivo* which enables it to bind to an MHC molecule at the cell surface without undue hindrance.

CORE RESIDUES

In an adaptive immune response, T lymphocytes are capable of recognising internal epitopes of a protein antigen. Antigen presenting cells (APC) take up protein antigens and degrade them into short peptide fragments. A peptide may bind to a major histocompatibility complex (MHC) class I or II molecule inside the cell and be carried to the cell surface. When presented at the cell surface in conjunction with an MHC molecule, the peptide may be recognised by a T cell (via the T cell receptor (TCR)), in which case the peptide is a T cell epitope.

An epitope is thus a peptide derivable from an antigen which is capable of binding to the peptide-binding groove of a MHC class I or II molecule and be recognised by a T cell.

The minimal epitope is the shortest fragment derivable from an epitope, which is capable of binding to the peptide-binding groove of a MHC class I or II molecule and being recognised by a T cell. For a given immunogenic region, it is typically possible

to generate a "nested set" of overlapping peptides which act as epitopes, all of which contain the minimal epitope but differ in their flanking regions.

By the same token, it is possible to identify the minimal epitope for a particular MHC molecule:T cell combination by measuring the response to truncated peptides. For example if a response is obtained to the peptide comprising residues 1-15 in the overlapping library, sets which are truncated at both ends (i.e. 1-14, 1-13, 1-12 etc. and 2-15, 3-15, 4-15 etc.) can be used to identify the minimal epitope.

The present invention provides peptides comprising a "core residue" sequence of FVIII which selected from the following list:

LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNOAS

LTRYYSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

These core residue sequences were predicted using HLA-DR2 binding algorithms to represent or comprise the minimal epitope for each region, as shown in the Examples.

APITOPES

The present inventors have previously determined that there is a link between the capacity of a peptide to bind to an MHC class I or II molecule and be presented to a T cell without further antigen processing, and the peptide's capacity to induce tolerance *in vivo* (WO 02/16410). If a peptide is too long to bind the peptide binding groove of an MHC molecule without further processing (e.g. trimming), or binds in an inappropriate conformation then it will not be tolerogenic *in vivo*. If, on the other hand, the peptide is of an appropriate size and conformation to bind directly to the MHC peptide binding groove and be presented to a T cell, then this peptide can be predicted to be useful for tolerance induction.

It is thus possible to investigate the tolerogenic capacity of a peptide by investigating whether it can bind to an MHC class I or II molecule and be presented to a T cell without further antigen processing *in vitro*.

The peptides of the present invention are apitopes (Antigen Processing-Independent epiTOPES) in that they are capable of binding to an MHC class II molecule and stimulating a response from factor VIII specific T cells without further antigen processing. Such apitopes can be predicted to cause tolerance to FVIII, following the rule-based method described in WO 02/16410.

A peptide of the present invention may be any length that is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing. Typically, the peptide of the present invention is capable of binding MHC class II.

Peptides that bind to MHC class I molecules are typically 7 to 13, more usually 8 to 10 amino acids in length. The binding of the peptide is stabilised at its two ends by contacts between atoms in the main chain of the peptide and invariant sites in the peptide-binding groove of all MHC class I molecules. There are invariant sites at both ends of the groove which bind the amino and carboxy termini of the peptide. Variations in peptide length are accommodated by a kinking in the peptide backbone, often at proline or glycine residues that allow the required flexibility.

Peptides which bind to MHC class II molecules are typically between 8 and 20 amino acids in length, more usually between 10 and 17 amino acids in length, and can be longer (for example up to 40 amino acids). These peptides lie in an extended conformation along the MHC II peptide-binding groove which (unlike the MHC class I peptide-binding groove) is open at both ends. The peptide is held in place mainly by main-chain atom contacts with conserved residues that line the peptide-binding groove.

PEPTIDE SEQUENCES

The first embodiment of the invention relates to a peptide comprising one of the following FVIII-derived sequences:

GTLMVFFGNVDSSGI

TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRHPQSWVHQIA

with one or more of the following modifications:

- (i) removal of one or more hydrophobic amino acid(s);
- (ii) replacement of one or more hydrophobic amino acid(s) with charged hydrophilic amino acid(s); and
- (iii) insertion of a charged amino acid at one or both terminus(i)

which modified peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

A list of standard amino acids, together with their side chain polarity, charge and hydropathy index is given in Table 1.

Table 1

Amino Acid	3-Letter	1-Letter	Side chain polarity	Side chain charge (pH 7)	Hydropathy index
Alanine	Ala	A	nonpolar	neutral	1.8
Arginine	Arg	R	polar	positive	-4.5
Asparagine	Asn	N	polar	neutral	-3.5
Aspartic acid	Asp	D	polar	negative	-3.5
Cysteine	Cys	C	nonpolar	neutral	2.5
Glutamic acid	Glu	E	polar	negative	-3.5
Glutamine	Gln	Q	polar	neutral	-3.5
Glycine	Gly	G	nonpolar	neutral	-0.4
Histidine	His	H	polar	positive	-3.2
Isoleucine	Ile	I	nonpolar	neutral	4.5
Leucine	Leu	L	nonpolar	neutral	3.8
Lysine	Lys	K	polar	positive	-3.9

Methionine	Met	M	nonpolar	neutral	1.9
Phenylalanine	Phe	F	nonpolar	neutral	2.8
Proline	Pro	P	nonpolar	neutral	-1.6
Serine	Ser	S	polar	neutral	-0.8
Threonine	Thr	T	polar	neutral	-0.7
Tryptophan	Trp	W	nonpolar	neutral	-0.9
Tyrosine	Tyr	Y	polar	neutral	-1.3
Valine	Val	V	nonpolar	neutral	4.2

Hydrophobic amino acids include: G, C, M, A, P, I, L, V and the aromatic amino acids F and W. Hydrophobic amino acids may be removed from the ends of the sequence or within the sequence.

Charged hydrophilic amino acids include: K, R, D, H and E. Hydrophobic amino acids may be exchanged with charged hydrophilic amino acids the ends of the sequence or within the sequence.

One or more charged amino acid(s) may be inserted at the N-terminus of the sequence. Advantageously, a positively charged amino acid is inserted or substituted at one terminus and a negatively charged amino acid is inserted/substituted at the other terminus in order to create a charge dipole.

Modification of the parent sequence should not significantly impair binding of the peptide to the peptide binding groove of an MHC molecule, its capacity to be recognised by a T cell, or its capacity to act as an epitope (bind to an MHC molecule and be presented to a T cell without further antigen processing). This may be readily tested using known antigen presentation assays and T-cell hybridomas.

The second embodiment of the invention relates to a peptide comprising the sequence

$X(aa)_n\text{-core sequence-(aa)}_m$

wherein X is a charged hydrophilic residue;

aa is an amino acid;

n is an integer between 0 and 5;

m is an integer between 0 and 5; and

the "core sequence" is selected from the following group of FVIII-derived peptides: LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

which peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

The sequence $(aa)_n$ or $(aa)_m$ can be any sequence of between 4 and 5 amino acids. For example, the peptide may have the sequence:

XDNIMVTFRNQAS

in which case, $n=3$ and $m=0$.

The third embodiment of the present invention relates to a peptide comprising the sequence:

$Y(aa)_n$ -core sequence- $(aa)_mZ$

wherein Y and Z are charged amino acids having reverse polarity;

aa is an amino acid;

n is an integer between 0 and 5;

m is an integer between 0 and 5; and

the "core sequence" is selected from the following group of FVIII-derived peptides:

LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

which peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

For example, for the peptide EDNIMVTFRNQASR,

Y=E;

(aa)_n = DNI

m=0; and

Z=R

The peptide may comprise the core residue sequence, together with additional flanking sequences at the N and/or C terminal end ((aa)_n and (aa)_m respectively), provided that the resulting peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing.

The flanking N and/or C terminal sequences may be derivable from the sequences flanking the core residue sequences in human FVIII.

APIPS

Various antigen processing independent presentation systems (APIPS) are known, including:

- a) fixed APC (with or without antibodies to CD28);
- b) Lipid membranes containing Class I or II MHC molecules (with or without antibodies to CD28); and
- c) purified natural or recombinant MHC in plate-bound form (with or without antibodies to CD28).

All of these systems are capable of presenting antigen in conjunction with an MHC molecule, but are incapable of processing antigen. In all these systems the processing function is either absent or disabled. This makes it possible to investigate whether a peptide can bind to an MHC class I or II molecule and be presented to a T cell without further antigen processing.

The use of fixed APC to investigate T cell responses is well known in the art, for example in studies to investigate the minimal epitope within a polypeptide, by measuring the response to truncated peptides (Fairchild *et al* (1996) Int. Immunol.

8:1035-1043). APC may be fixed using, for example formaldehyde (usually paraformaldehyde) or glutaraldehyde.

Lipid membranes (which may be planar membranes or liposomes) may be prepared using artificial lipids or may be plasma membrane/microsomal fractions from APC.

In use, the APIPS may be applied to the wells of a tissue culture plate. Peptide antigens are then added and binding of the peptide to the MHC portion of the APIPS is detected by addition of selected T cell lines or clones. Activation of the T cell line or clone may be measured by any of the methods known in the art, for example via ^3H -thymidine incorporation or cytokine secretion.

FACTOR VIII

The core sequence of peptide of the invention is derivable from factor VIII. One or both flanking sequences $((\text{aa})_n$ and $(\text{aa})_m$) may also be derivable from factor VIII.

Factor VIII participates in the intrinsic pathway of blood coagulation; factor VIII is a cofactor for factor IXa which, in the presence of Ca^{+2} and phospholipids, converts factor X to the activated form Xa.

The factor VIII gene produces two alternatively spliced transcripts. Transcript variant 1 encodes a large glycoprotein, isoform a, which circulates in plasma and associates with von Willebrand factor in a noncovalent complex. This protein undergoes multiple cleavage events. Transcript variant 2 encodes a putative small protein, isoform b, which consists primarily of the phospholipid binding domain of factor VIIIc. This binding domain is essential for coagulant activity.

The complete 186,000 base-pair sequence of the human factor VIII gene was elucidated in the mid 1980s (Gitschier et al (1984) Nature 312 326-330). At the same time, DNA clones encoding the complete 2351 amino acid sequence were used to produce biologically active factor VIII in cultured mammalian cells (Wood et al (1984) Nature 312:330-337). The complete 2,351 amino acid sequence for human factor VIII is given in SEQ ID No. 1.

The core residues of peptide of the present invention are derivable from factor VIII. Optionally the flanking sequence(s) may also be derivable from factor VIII if they are the same as the sequences flanking the core sequence in the native FVIII polypeptide. This sequence may be obtainable or obtained from cleavage of the factor VIII sequence.

SOLUBILITY

The peptide of the first embodiment of the invention is a modified form of one of the following peptides:

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPTHY
PPLLTRYLRHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLECHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRHPQSWVHQIA

These peptides have already been shown to act as apitopes and be tolerogenic *in vivo* (See examples and International patent application No PCT/GB2008/003996).

It has since come to light that solubility is an important consideration in peptide-mediated tolerance induction. Solubility may be improved by one or more of the following:

- (i) removal of one or more hydrophobic residues;
- (ii) addition/substitution to add one or more charged hydrophilic residues
- (iii) placing positively and negatively charged amino acids at either end to create a charge dipole.

The modified peptide may be more soluble than the parent (unmodified) peptide. The modified peptide may have 2, 3, 4, or 5-fold greater solubility than the parent peptide. The peptide may be soluble at concentrations of up to 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, or 5 mg/ml.

TOLERANCE

T cell epitopes play a central role in the adaptive immune response to any antigen, whether self or foreign. The central role played by T cell epitopes in hypersensitivity diseases (which include allergy, autoimmune diseases and transplant rejection) has been demonstrated through the use of experimental models. It is possible to induce inflammatory or allergic diseases by injection of synthetic peptides (based on the structure of T cell epitopes) in combination with adjuvant.

By contrast, it has been shown to be possible to induce immunological tolerance towards particular antigens by administration of peptide epitopes in soluble form. Administration of soluble peptide antigens has been demonstrated as an effective means of inhibiting disease in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE – a model for multiple sclerosis (MS)) (Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); and experimental models of arthritis, diabetes, and uveoretinitis (reviewed in Anderton and Wraith (1998) as above). This has also been demonstrated as a means of treating an ongoing disease in EAE (Anderton and Wraith (1998) as above).

Tolerance is the failure to respond to an antigen. Tolerance to self antigens is an essential feature of the immune system, when this is lost, autoimmune disease can result. The adaptive immune system must maintain the capacity to respond to an enormous variety of infectious agents while avoiding autoimmune attack of the self antigens contained within its own tissues. This is controlled to a large extent by the sensitivity of immature T lymphocytes to apoptotic cell death in the thymus (central tolerance). However, not all self antigens are detected in the thymus, so death of self-reactive thymocytes remains incomplete. There are thus also mechanisms by which tolerance may be acquired by mature self-reactive T lymphocytes in the peripheral

tissues (peripheral tolerance). A review of the mechanisms of central and peripheral tolerance is given in Anderton *et al* (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

In haemophilia A, patients have a defect in the factor VIII gene. This means that factor VIII is not recognised as a "self" antigen by the immune system. When factor VIII is administered during coagulation factor replacement therapy, therefore, an alloimmune response is generated to the foreign protein, leading to the production of FVIII inhibitor antibodies.

The peptides of the present invention are capable of inducing tolerance to factor VIII such that when FVIII is administered therapeutically, it does not induce an immune response and FVIII inhibitors do not develop.

Acquired haemophilia is an autoimmune disease in which tolerance to factor VIII breaks down. In this case, peptides of the present invention may be administered to reinstate tolerance to this self protein and curtail the pathogenic immune response.

Tolerance may result from or be characterised by the induction of anergy in at least a portion of CD4+ T cells. In order to activate a T cell, a peptide must associate with a "professional" APC capable of delivering two signals to T cells. The first signal (signal 1) is delivered by the MHC-peptide complex on the cell surface of the APC and is received by the T cell via the TCR. The second signal (signal 2) is delivered by costimulatory molecules on the surface of the APC, such as CD80 and CD86, and received by CD28 on the surface of the T cell. It is thought that when a T cell receives signal 1 in the absence of signal 2, it is not activated and, in fact, becomes anergic. Anergic T cells are refractory to subsequent antigenic challenge, and may be capable of suppressing other immune responses. Anergic T cells are thought to be involved in mediating T cell tolerance.

Without wishing to be bound by theory, the present inventors predict that peptides which require processing before they can be presented in conjunction with MHC molecules do not induce tolerance because they have to be handled by mature antigen presenting cells. Mature antigen presenting cells (such as macrophages, B cells and dendritic cells) are capable of antigen processing, but also of delivering both signals 1

and 2 to a T cell, leading to T cell activation. Apitopes, on the other hand, will be able to bind class II MHC on immature APC. Thus they will be presented to T cells without costimulation, leading to T cell anergy and tolerance.

Of course, apitopes are also capable of binding to MHC molecules at the cell surface of mature APC. However, the immune system contains a greater abundance of immature than mature APC (it has been suggested that less than 10% of dendritic cells are activated, Summers et al. (2001) Am. J. Pathol. 159: 285-295). The default position to an apitope will therefore be anergy/tolerance, rather than activation.

The induction of tolerance to FVIII can be monitored *in vivo* by looking for a reduction in the level of:

- (i) FVIII inhibitory antibodies;
- (ii) CD4+ T cells specific for FVIII
- (iii) B cells capable of secreting FVIII inhibitory antibodies

by techniques known in the art.

It has been shown that, when tolerance is induced by peptide administration, the capacity of antigen-specific CD4+ T cells to proliferate is reduced. Also, the production of IL-2, IFN- γ and IL-4 production by these cells is down-regulated, but production of IL-10 is increased. Neutralisation of IL-10 in mice in a state of peptide-induced tolerance has been shown to restore completely susceptibility to disease. It has been proposed that a population of regulatory cells persist in the tolerant state which produce IL-10 and mediate immune regulation (Bürkhardt *et al* (1999) Int. Immunol. 11:1625-1634).

The induction of tolerance can therefore also be monitored by various techniques including:

- (a) the induction of anergy in CD4+ T cells (which can be detected by subsequent challenge with FVIII *in vitro*);
- (b) changes in the CD4+ T cell population, including
 - (i) reduction in proliferation;
 - (ii) down-regulation in the production of IL-2, IFN- γ and IL-4; and
 - (iii) increase in the production of IL-10.

As used herein, the term "tolerogenic" means capable of inducing tolerance.

COMPOSITION

The present invention also relates to a composition, such as a pharmaceutical composition comprising one or more peptide(s) according to the invention.

The peptide may comprise a plurality of peptides, for example, two, three, four, five or six peptides.

The composition of the present invention may be for prophylactic or therapeutic use.

When administered for prophylactic use, the composition may reduce or prevent the generation of an immune response to FVIII. The level of immune response is less than would have been obtained in the patient had not been treated with the composition. The term "reduce" indicates that a partial reduction in immune response is observed, such as a 50%, 70%, 80% or 90% reduction in the response that would have been observed in the patient had not been treated with the composition (or in the response observed in an untreated patient over the same time-frame). The term "prevent" indicates that no appreciable immune response to FVIII is observed.

When administered for therapeutic use, the composition may suppress an already ongoing immune response to FVIII. The term "suppress" indicates a reduction in the level of an on-going immune response, compared to the level before peptide treatment, or the level which would have been observed at the same time point had the treatment not been given.

Treatment with the composition of the present invention may cause a reduction in levels of any or all of the following:

- (i) FVIII inhibitory antibodies;
- (ii) CD4+ T cells specific for FVIII
- (iii) B cells secreting FVIII inhibitory antibodies.

Detection of all these factors can be carried out by techniques known in the art, such as ELISA, FACS etc.

Treatment with the composition of the present invention may also or alternatively cause anergy in CD4+ T cells specific for FVIII. Anergy can be detected by for example subsequent challenge with FVIII *in vitro*.

It is important to bear in mind that not all immune responses to FVIII are pathogenic. Non-inhibitory anti-FVIII antibodies may be found in haemophilia patients without inhibitors (Moreau *et al* (2000) Blood 95:3435-41) and approximately 15% of healthy blood donors (Algiman *et al* (1992) 89:3795-9).

FVIII inhibitors may be detected by the Nijmegen modification of the clotting Bethesda assay, in which the ability of the patient's plasma to inactivate FVIII in normal plasma is tested. A Bethesda unit is defined as the amount of antibody that neutralizes 50% of plasma FVIII activity, and titres of 0.6BU or greater suggest the presence of antibody.

Inhibitors are generally classified as low titre if the level is <5 BU and high titre if ≥ 5 BU.

The level of circulating FVIII inhibitory antibodies may be reduced to 90%, 75%, 50%, 20%, 10% 5% of the level of antibodies which would have been observed had the patient not received treatment.

The level of circulating FVIII inhibitory antibodies may be reduced to 5, 4, 3, 2, 1 or 0.5 BU.

The peptides and composition of the invention may increase the amount or proportion of therapeutically administered FVIII which is available to aid clotting in a patient. This is due to the reduction in FVIII inhibitors which may effectively remove a proportion of FVIII from exerting its therapeutic function. The peptide or composition

of the invention may increase the amount of available FVIII by, for example, 10%, 25%, 50% 75% or 100%.

The peptides and composition of the invention may thus reduce the amount of FVIII which needs to be administered to aid clotting in a patient.

FORMULATION

The composition may be prepared as an injectable, either as liquid solution or suspension; solid form, suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection may also be prepared. The preparation may also be emulsified, or the peptides encapsulated in liposomes. The active ingredients may be mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline (for example, phosphate-buffered saline), dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof.

In addition, if desired, the composition may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents and/or pH buffering agents. Buffering salts include phosphate, citrate, acetate. Hydrochloric acid and/or sodium hydroxide may be used for pH adjustment. For stabilisation, disaccharides may be used such as sucrose or trehalose.

If the composition comprises a plurality of peptides, the relative ratio of the peptides may be approximately equal. Alternatively the relative ratios of each peptide may be altered, for example, to focus the tolerogenic response on a particular sub-set of autoreactive T-cells or if it is found that one peptide works better than the others in particular HLA types.

After formulation, the composition may be incorporated into a sterile container which is then sealed and stored at a low temperature, for example 4°C, or it may be freeze-dried.

Conveniently the composition is prepared as a lyophilized (freeze dried) powder. Lyophilisation permits long-term storage in a stabilised form. Lyophilisation

procedures are well known in the art, see for example <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Bulking agents are commonly used prior to freeze-drying, such as mannitol, dextran or glycine.

The composition may be administered in a convenient manner such as by the oral, intravenous (where water soluble), intramuscular, subcutaneous, sublingual, intranasal, intradermal or suppository routes or implanting (e.g. using slow release molecules).

The composition may advantageously be administered via intranasal, subcutaneous or intradermal routes.

The peptide and composition of the invention may be used to treat a human subject. The subject may have haemophilia A, in particular severe haemophilia A. The subject may be genetically deficient in FVIII. The subject may have acquired haemophilia. The subject may have inhibitory anti-FVIII antibodies.

The subject may be undergoing or about to undergo coagulant replacement therapy with FVIII.

The subject may be undergoing or about to undergo gene therapy with the FVIII gene.

The subject may be an HLA-haplotype which is associated with a predisposition to develop inhibitory anti-FVIII alloantibodies or autoantibodies. The subject may express HLA-DR2. Methods for determining the HLA haplotype of an individual are known in the art.

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject and it will vary with the age, weight and response of the particular patient.

In a preferred embodiment a "dose escalation" protocol may be followed, where a plurality of doses is given to the patient in ascending concentrations. Such an approach has been used, for example, for phospholipase A2 peptides in immunotherapeutic

applications against bee venom allergy (Müller *et al* (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 and Akdis *et al* (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

KITS

Conveniently, if the composition comprises a plurality of peptides, they may be administered together, in the form of a mixed composition or cocktail. However, there may be circumstances in which it is preferable to provide the peptides separately in the form of a kit, for simultaneous, separate, sequential or combined administration.

The kit may also comprise mixing and/or administration means (for example a vapouriser for intranasal administration; or a syringe and needle for subcutaneous/intradermal dosing). The kit may also comprise instructions for use.

The pharmaceutical composition or kit of the invention may be used to treat and/or prevent a disease.

In particular, the composition/kit may be used to treat and/or prevent haemophilia A or acquired haemophilia.

HAEMOPHILIA A

Hemophilia A (classic hemophilia), is caused by the deficiency of Factor VIII.

Hemophilia A has an estimated incidence of 1 in 10,000 males, while hemophilia B is estimated to occur in one in 40,000 males. Approximately 1 woman in 5,000 is a carrier for hemophilia A, and 1 in 20,000 is a carrier of hemophilia B.

Hemophilia is typically divided into three classes: severe, moderate and mild, based on the level of clotting factor in the blood. In severe hemophilia, there is less than 1 percent of normal clotting factor. The degree of severity tends to be consistent from generation to generation.

Contrary to popular belief, minor cuts and wounds do not usually present a threat to hemophiliacs. Rather, the greatest danger comes from spontaneous bleeding that may

occur in joints and muscles. This is most prone to occur during years of rapid growth, typically between the ages of 5 and 15 years.

Repeated spontaneous bleeding in joints may cause arthritis, and adjacent muscles become weakened. Pressure on nerves caused by the accumulation of blood may result in pain, numbness, and temporary inability to move the affected area.

Haemophilia A is usually diagnosed with a blood test to determine the effectiveness of clotting and to investigate whether the levels of clotting factors are abnormal.

The development of purified clotting factors in the 1970s, isolated from donated blood, significantly improved the long-term outlook for hemophiliacs. Mild to moderate haemophiliacs can use treatment with FVIII on an *ad hoc* basis, whereas severe haemophiliacs may require regular, indefinite treatment.

Previously, patients were given factor VIII concentrates pooled from thousands of plasma donations. This led to significant problems of contamination with viral pathogens, particularly the human immunodeficiency virus and the hepatitis viruses. Monoclonal antibody purification techniques, heat inactivation, and virucidal detergent treatments have rendered plasma-derived concentrates relatively safe.

Recombinant DNA technology has now provided a series of synthetic products, such as RecombinateTM and KogenateTM. Kogenate is made using baby hamster kidney cells expressing human factor VIII. The resulting factor is highly purified, eliminating any possibility of transmission of virus from plasma.

The peptide or composition of the present invention may be administered before and/or during factor VIII replacement therapy.

Hemophilia A is an ideal disease target for gene therapy since i) it is caused by a mutation in a single identified gene, ii) a slight increase in clotting factor levels *in vivo* can convert severe hemophilia into milder disease, and iii) current replacement therapies are considered suboptimal. Also, there is a wide range of safety if there is an "overshoot" of desired level of coagulation activity.

Unfortunately, to date the promise of gene therapy as a cure for haemophilia has not been realized, primarily because of difficulties in finding a gene delivery system which is sufficiently non-immunogenic to allow for long term expression of the clotting factor.

The peptides of the present invention would also be suitable for tolerising a subject prior to gene therapy with factor VIII and/or managing FVIII inhibitor formation in a patient following gene therapy.

ACQUIRED HAEMOPHILIA

Acquired haemophilia is characterised by the presence of autoantibody inhibitors against FVIII in individuals with previously normal coagulation. It is a rare condition, with an estimated incidence of 1-3 per million population per year. The mortality rate associated with acquired autoantibody inhibitors approaches 25% versus the substantially lower risk of death in those with alloantibodies.

Compared to alloantibody inhibitor patients, acquired hemophilia is characterized by: (1) a more severe bleeding pattern; (2) higher incidence in older population; (3) occurrence in conjunction with identifiable underlying autoimmune diseases, lymphoproliferative or solid tumor malignancies, pregnancy, and use of certain antibiotics such as penicillin and sulfonamides in approximately 50% of cases; and (4) in vitro inhibitor activity that follow a type II pharmacokinetic pattern with incomplete neutralization of the targeted clotting factor activity by the autoantibody, typically resulting in residual factor VIII levels ranging between 2%-18% in patient plasma.

The peptide or composition of the present invention may be administered to a patient with acquired haemophilia, or to a patient believed to be at risk of developing acquired haemophilia due to, for example:

- i) imminent treatment with, for example penicillin or a sulfonamide
- ii) progression of a tumour or other malignancy.
- iii) imminent or early pregnancy.

The invention will now be further described by way of Examples, which are meant to serve to assist one of ordinary skill in the art in carrying out the invention and are not intended in any way to limit the scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1: Selection of HLA-DR2 Factor VIII peptides

A series of FDVIII 15mer peptides were compared using three HLA-DR binding algorithms:

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

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

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

Peptides were selected which were predicted to be HLA-DR2-binding by more than one of the programmes and flanking sequences were designed for the predicted core residues (table 2).

TABLE 2

Peptide No	FVIII First AA	Sequence in single amino acid code	Also referred to herein as:
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIIARYIRLHPHY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYYSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFLPNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

Example 2: Investigating the response of HLA-DR2 restricted cells from factor VIII immunised mice to peptides

HLA-DR2 transgenic mice were immunised with human factor VIII in adjuvant. Draining lymph node cells were collected and restimulated *in vitro* with different concentrations of the 12 peptides from table 2. The results are shown in Figure 1.

HLA-DR2 restricted cells from factor VIII immunised mice clearly respond strongly to peptide DNIMV (1st amino acid 1788). There are also responses to peptides PRCLT (545) and PPIIA (2161).

Example 3: Investigating the response of T cells from HLA-DR2 mice to peptides

HLA-DR2 mice were first immunised with factor VIII in adjuvant. Spleen cells from immune mice were restimulated *in vitro* with factor VIII and the resulting lymphoblasts were fused with the BW5147 thymoma using polyethylene glycol.

T-cell hybridomas were selected in HAT medium and the hybridomas cloned and tested for their response to factor VIII. The hybridomas were then screened for their response to the 12 predicted peptides. Of the 27 hybridomas screened, 11 responded to DNIMV, 3 to PRCLT and 3 to PPIIA, although the response to PPIIA was weaker and less specific. The response of two hybridomas specific for DNIMV and PRCLT is shown in Figure 2.

Example 4 - Investigating the response of lymph node cells from FVIII-DR2+ mice to peptides

HLA-DR2 transgenic mice were crossed with factor VIII deficient mice to create a model of haemophilia expressing the human HLA class II MHC molecule.

These FVIII-DR2+ animals were immunised with factor VIII in adjuvant. Draining lymph nodes were isolated and tested for their response to the peptide panel. As shown in Figure 3, these cells responded well to PRCLT and DNIMV. There was a weak response to GTLMV and significant response to RYLRI.

Example 5 - Investigating the response of T cells from HLA-DR2 mice to peptides

Factor VIII deficient mice expressing HLA-DR2 were immunised with factor VIII in adjuvant. Spleen cells from the immunised mice were restimulated *in vitro* with factor VIII and the resulting lymphoblasts were fused with BW5147, as described above. T-cell hybridomas were screened for their response to the 12 predicted peptides. Yet again, the majority of hybridomas responded to peptides DNIMV and PRCLT. Of 19 hybridomas specific for factor VIII, 10 responded to DNIMV, 6 to PRCLT, 1 to PPILA, 1 to SLYIS and 1 to DTLLI. Examples of responses by these hybridomas are shown in Figure 4.

Based on these experiments it is clear that two peptides DNIMV (first amino acid number 1788) and PRCLT (first amino acid 545) constitute the immunodominant T-cell epitopes in the HLA-DR2 restricted T-cell response to human factor VIII.

Example 6 - DNIMV and PRCLT behave as apitopes

In order to be an apitope, a peptide must be capable of binding to an MHC class I or II molecule without further antigen processing (i.e. trimming) and be presented to a T cell. In the present case, the capacity of peptides to be presented by fixed APC was investigated.

Mgar cells were either fresh or fixed with 1% paraformaldehyde. Clones were tested for antigenic specificity by culturing 100µl of hybridoma cells with 5×10^4 Mgar cells in the presence and absence of 20µg/ml rhFVIII or peptide epitopes overnight. Supernatants were then collected and assessed for IL-2 production by ELISA. The fact that rhFVIII must be presented by live Mgar cells demonstrates that the intact protein requires antigen processing to be presented. Peptides DNIMV and PRCLT, on the other hand, are presented by both live and fixed Mgar cells indicating that these peptides function as apitopes (Figure 5).

Example 7 - Determination of the range of peptide epitopes capable of functioning as apitopes

The range of peptide epitopes capable of functioning as apitopes in the sequences surrounding DNIMV, PRCLT and the other peptides was identified by preparing panels of overlapping peptides (shown on pages 36-37) and screening these using the T-cell hybridomas using the same method as Example 5 (Figure 7).

Example 8 - DNIMV and PRCLT induce tolerance to whole factor VIII protein

HLA-DR2 transgenic mice were treated with either of the two soluble peptides, or PBS as a control, prior to immunisation with factor VIII in adjuvant. Draining lymph nodes were isolated and the cells restimulated *in vitro* with factor VIII protein in order to assess the immune status of the mice. As shown in Figure 6, treatment of mice with either DNIMV or PRCLT led to a substantial suppression of the immune response to factor VIII.

Example 9 - Investigation of whether DNIMV and PRCLT able to induce tolerance in the factor VIII knockout mouse

It was known from Example 8 that these two peptides are able to prevent the immune response to factor VIII in mice expressing endogenous factor VIII. The experiment was repeated with FVIII-DR2+ animals to determine whether these peptides also prevent the immune response to factor VIII in factor VIII deficient mice.

Example 10 - Investigation of whether DNIMV and PRCLT in combination are able to induce tolerance in the factor VIII knockout mouse

The two peptides which were shown to individually reduce the immune response to factor VIII in factor VIII deficient mice in Example 9 were combined. As shown in Figure 8, treatment of mice with both DNIMV and PRCLT led to a substantial suppression of the immune response to factor VIII, as shown by the decrease in IFN-gamma production. IFN-gamma is the major class switch lymphokine required for neutralising antibodies in the mouse. The effect demonstrated was greater than that observed using either peptide alone.

Example 11: The induction of tolerance using a modified peptide

The peptide DNIMV is partly, but not completely soluble. In order to improve the solubility of the peptide, a modified version was designed with the following sequence: EDNIMVTFRNQASR.

This is extended at the N-terminus to add a charged hydrophilic residue. It is also truncated at the C-terminus to remove the proline and tyrosine residues. Furthermore by placing positively and negatively charged amino acids at either end of the peptide a charge dipole is created reported to increase solubility.

The modified peptide is more soluble than DNIMV and sufficiently soluble to allow intranasal peptide delivery. In order to assess the induction of tolerance using this peptide epitope, FVIII deficient mice were taken and half treated with the modified EDNIMV peptide (referred to as 'tolerised' in Figure 9). The mice were then immunised with DNIMV in CFA and 10 days later draining lymph nodes were collected and stimulated *in vitro* with either DNIMV or EDNIMV. Figure 9 shows the results for responses from either naïve or tolerised mice stimulated with either DNIMV or EDNIMV *in vitro*.

The results demonstrate that EDNIMV is able to recall an immune response from mice immunised with DNIMV. Furthermore, they demonstrate very clearly that mice tolerised with EDNIMV fail to mount an immune response to DNIMV *in vivo* as revealed by the lack of response to either DNIMV or EDNIMV *in vitro* after priming with DNIMV in CFA.

Example 12: EDNIMV induces tolerance to whole factor VIII protein

The experiment described in Example 8 is repeated for the modified peptide EDNIMV to demonstrate that EDNIMV is able to suppress the immune response to the whole factor VIII protein.

Methods

(i) Recall responses for DR2+ mice primed with rhFVIII

HLA-DR2+ murine MHC class II null mice were immunised with 40µg rhFVIII emulsified in Complete Freund's Adjuvant supplemented with 400µg heat-killed *M.tuberculosis H37Ra*, subcutaneously at the base of the tail. 10 days later the mice were sacrificed and the draining lymph nodes removed. Single cell suspensions were prepared and lymphocytes incubated at $4-5 \times 10^5$ cells per well in 96-well flat bottomed plates for 72 hours with the indicated concentrations of peptide or control antigens before pulsing with 0.5µCi/well tritiated thymidine for a further 16 hours. Plates were then frozen before cells were harvested onto glass filter mats and radioactive incorporation measured using a liquid scintillation β-counter.

(ii) FVIII peptide specificity of T cell hybridomas generated from DR2+ mice

HLA-DR2+ murine MHC class II null mice were immunised as above. On day 10 draining lymph nodes were removed and lymphocytes cultured at 2.5×10^6 cells/ml, 1ml/well in 24 well plates in the presence of 20µg/ml rhFVIII for 3 days. Following this stimulation, lymphocytes were recovered, washed and fused with TCRαβ BW fusion partner cells at a ratio of 4 BW cells to 1 lymphocyte, using polyethylene glycol as described by Nelson et al (1980) *PNAS* 77(5):2866. Fused cells were carefully washed and then plated out in flat bottomed 96 well plates for 2 days before the addition of HAT medium to select for T cell hybridomas. Cells were monitored for growth and approximately 10 days after fusions were performed, individual clones were selected and transferred to 24 well plates in HAT medium. Clones were maintained in HAT medium for at least 2 weeks before being weaned into HT medium and then complete medium. Clones were tested for antigenic specificity by culturing 100µl of hybridoma cells with 5×10^4 Mgar cells in the presence and absence of 20µg/ml rhFVIII overnight. Supernatants were then collected and assessed for IL-2 production by ELISA, with clones producing IL-2 in response to rhFVIII being considered positive for FVIII-specificity. To investigate the repertoire of predicted FVIII peptides FVIII-specific clones were again tested for IL-2 production, following overnight incubation with 20µg/ml of each of the 12 peptides.

(iii) Recall responses for FVIII-/- mice primed with rhFVIII

The same method was followed as for (i), except the mice were FVIII-deficient, HLA-DR2+ and murine MHC class II null.

(iv) FVIII peptide specificity of T cell hybridomas generated from FVIII-/- mice

The same method was followed as for (ii), except the mice were FVIII-deficient and HLA-DR2+.

(v) Tolerisation of FVIII-specific responses in DR2+ mice by pre-treatment with immunodominant FVIII peptides

HLA-DR2+ murine MHC class II null mice were treated 3 times with 100µg of DNIMV, PRCLT or PPIIA dissolved in PBS, or the equivalent volume of PBS alone. Peptides were administered intraperitoneally, with 3-4 days between each dose. Following the final administration, mice were primed with rhFVIII emulsified in complete Freund's adjuvant as for (i). 10 days later, draining lymph nodes were recovered and lymphocytes subsequently cultured *in vitro* with rhFVIII, or each of the tolerising peptides as well as control antigens, for 72 hours before the addition of tritiated thymidine as for (i).

(vi) Tolerisation of FVIII-specific responses in DR2+ mice by pre-treatment with a combination immunodominant FVIII peptides

HLA-DR2+ murine MHC class II null mice were treated 3 times with DNIMV, PRCLT or a combination of both DNIMV and PRCLT dissolved in PBS, or the equivalent volume of PBS alone. Peptides were administered intraperitoneally, over 8 days. Following the final administration, mice were primed with rhFVIII emulsified in complete Freund's adjuvant as for (i). 10 days later, draining lymph nodes were recovered and lymphocytes subsequently re-stimulated *in vitro* with rhFVIII. The supernatants were then collected and IFN-gamma was measured.

All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in

connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular immunology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

SEQ ID No.1

1 mqieltstcfff lclrfcfsa tryylgave lswdymqsdll gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvykktlf.veftdhlfni akprppwmgll lqptiqaevy dtvvtlknm ashpvslhav
 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpq gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
 181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
 241 aasarawpkm htvngyvnrs lpgligchrk svywhvigmg tpevhsifl egthflvmh
 301 rqaaleispi tftaqtllm dlqqlfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlmkne
 361 eaedydddit dsemdivrfd ddnspsfqi rsvakkhpkf wvhyiaaeee dwdyapivla
 421 pddrsyksqy lnnqppqigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
 481 liifknqasr pyniypghit dvrplysrrl pkgvkhkdf pilpgeifky kwvtvedgp
 541 tksdprcltr yysfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilsvfde
 601 nrswyiteni qrlpnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
 661 igaqtdflsv ffsqytfkhk mvyedtlfl pfsgetvfms menpglwilg chnsdfmrg
 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknaieprs fsqhsrhpst rqqkfnatti
 781 pendiektdp wfahrtpmpk iqnvssdill mlrqspthp glslsdiea kyetfsddps
 841 pgaidsnsl semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrln klgtaatel kklfkvsst
 901 snnlstips dnlaagtndt sslgppsmvp hydsqldtl fgksspite sgglslsee
 961 nndsklesg lmsqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkf vplihdml mdknatarl
 1081 nhmsnktss knmemvqgk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
 1141 qgppskqlvs lgpeksvegq nlfeknkvv vgkgefkdv glkemvfpss mlfiltldn
 1201 lhenhthnqe kkieeiekk etiqenvvil pqlhtvtgk nfmknfls trqnvegsyd
 1261 gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahskk geeenleglg nqtqiveky acttrispnt
 1321 sqqnfvtrs kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
 1381 kgaitqspls dcltrshsp qanrsplia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpaasy
 1441 rkkdsgvqes shflqgakk nlsalitle mtgdqrevgs lqtsatnsvt ykkventvlp
 1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldiv egslqgteg aikwneanrp
 1561 gkvplrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtilsl
 1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqr tericsqnpp vlkrhqreit rtilqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm sssphvlmr
 1741 aqsgsvpqk kvvfqefidg stqplyrge lnehlgilgp yiraevedni mvtrnqasr
 1801 pysfyslsls yeedqrqgae prknfvkone tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhsgl igpvlvchtn tlhpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
 1921 pcniqmedpt fkenyrthai ngymdtpg lvmaqdqrr wyllsmgsne nihsihfsg
 1981 vftvrkkeey kmalynlypg vfetvemlps kagiwrvecl igehlhagms tlflvysnkc
 2041 qtlplmasgh irdfqitasg qyqwapkla rhyysgsina wstkepfswi kvdlapmii
 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnfn
 2161 ppiariyrl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqtkmktv gvtqgvksl ltsmyvkefl
 2281 issqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvnslppl ltrylrhpq swvhqialm
 2341 evlgceaql y

Overlapping peptide panels prepared in Example 7

Overlapping set for DTLIIFKNQASRPY

1.	473-488	YGEVGDTLIIFKNQ
2.	474-489	GEVGDTLIIFKNQA
3.	475-490	EVGDTLIIFKNQAS
4.	476-491	VGDTLIIFKNQASR
5.	477-492	GDTLIIFKNQASRP
6.	478-493	DTLIIFKNQASRPY
7.	479-494	TLIIFKNQASRPYN
8.	480-495	LIIFKNQASRPYNI
9.	481-496	IIFKNQASRPYNTY
10.	482-497	IFKNQASRPYNTYP
11.	483-498	IFKNQASRPYNTYPH

Overlapping set for PRCLTRYSSFVNME

1.	540-554	PTKSDPRCLTRYSS
2.	541-555	TKSDPRCLTRYSSF
3.	542-556	KSDPRCLTRYSSFV
4.	543-557	SDPRCLTRYSSFVN
5.	544-558	DPRCLTRYSSFVNM
6.	545-559	PRCLTRYSSFVNME
7.	546-560	RCLTRYSSFVNMER
8.	547-561	CLTRYSSFVNMERD
9.	548-562	LTRYSSFVNMERDL
10.	549-563	TRYSSFVNMERDLA
11.	550-564	RYSSFVNMERDLAS

Overlapping set for 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

Overlapping set for SLYISQFIMYSLDG

1.	2109-2123	RQKFSSLYISQFIM
2.	2110-2124	QKFSSLYISQFIMY

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

Overlapping set for PPIARYIRLHPHXY

1. 2156-2170	HNIFNPPIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIARYIRLHPT
5. 2160-2174	NPPPIARYIRLHPH
6. 2161-2175	PPPIARYIRLHPHXY
7. 2162-2176	PIARYIRLHPHXYH
8. 2163-2177	IARYIRLHPHXYSI
9. 2164-2178	IARYIRLHPHXYSIR
10. 2165-2179	ARYIRLHPHXYSIRS
11. 2166-2180	RYIRLHPHXYSIRST

Overlapping set for RYLRHPQSWVHQIA

1. 2317-2331	PPLLTRYLRHPQSW
2. 2318-2332	PLLTRYLRHPQSWV
3. 2319-2333	LLTRYLRHPQSWVH
4. 2320-2334	LTRYLRHPQSWVHQ
5. 2321-2335	TRYLRHPQSWVHQI
6. 2322-2336	RYLRHPQSWVHQIA
7. 2323-2337	YLRHPQSWVHQIAL
8. 2324-2338	LRHPQSWVHQIALR
9. 2325-2339	RHPQSWVHQIALRM
10. 2326-2340	IHPQSWVHQIALRME
11. 2327-2341	HPQSWVHQIALRMEV

CLAIMS

1. A peptide comprising one of the following FVIII-derived sequences:

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRHPQSWVHQIA

with one or more of the following modifications:

- (i) removal of one or more hydrophobic amino acid(s);
- (ii) replacement of one or more hydrophobic amino acid(s) with charged hydrophilic amino acid(s); and
- (iii) insertion of a charged amino acid at one or both terminus(i)

which modified peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

2. A peptide comprising the sequence

$X(aa)_n\text{-core sequence-(aa)}_m$

wherein X is a charged hydrophilic residue;

aa is an amino acid;

n is an integer between 0 and 5;

m is an integer between 0 and 5; and

the "core sequence" is selected from the following group of FVIII-derived

peptides: LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYYSFV

MVTFRNQAS

LRHPQSWV

which peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

3. A peptide according to claim 1, which comprises the sequence
XDNIMVTFRNQAS.

4. A peptide comprising the sequence:
Y(aa)_n-core sequence-(aa)_mZ
wherein Y and Z are charged amino acids having reverse polarity;
aa is an amino acid;
n is an integer between 0 and 5;
m is an integer between 0 and 5; and

the "core sequence" is selected from the following group of FVIII-derived peptides:

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSFV
MTFRNQAS
LRIHPQSWV

which peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further antigen processing and being recognised by a factor VIII specific T cell.

5. A peptide according to claim 4, which comprises the sequence:
YDNIMVTFRNQASZ
6. A peptide according to claim 4 or 5, wherein Y is a positively charged amino acid and Z is a negatively charged amino acid.
7. A peptide according to claim 4, 5 or 6, wherein Z is K or R.
8. A peptide according to any of claims 2 to 7, wherein X or Y is D or E.
9. A peptide according to any preceding claim, which comprises the sequence
EDNIMVTFRNQASR.

10. A peptide according to any preceding claim which consists of the sequence EDNIMVTFRNQASR.
11. A composition comprising a plurality of peptides, including one or more peptide(s) according to any preceding claim.
12. A peptide according to any of claims 1 to 10, or a composition according to claim 11, for use in suppressing or preventing the production of factor VIII inhibitor antibodies *in vivo*.
13. The use of a peptide according to any of claims 1 to 10, or a composition according to claim 11, in the manufacture of a medicament to suppress or prevent the production of factor VIII inhibitor antibodies *in vivo*.
14. A method for suppressing or preventing the production of factor VIII inhibitor antibodies in a subject, which comprises the step of administration of a peptide according to any of claims 1 to 10, or a composition according to claim 11, to the subject.
15. A method for treating haemophilia in a subject which comprises the step of administration of a peptide according to any of claims 1 to 10, or a composition according to claim 11, to the subject.
16. A method according to claim 14 or 15, wherein the subject has haemophilia A, and is undergoing, or is about to undergo, factor VIII replacement therapy.
17. A method according to claim 14 or 15, wherein the subject has, or is at risk from contracting, acquired haemophilia.
18. A method according to any of claims 14 to 17, wherein the subject is HLA-DR2.

1 / 15

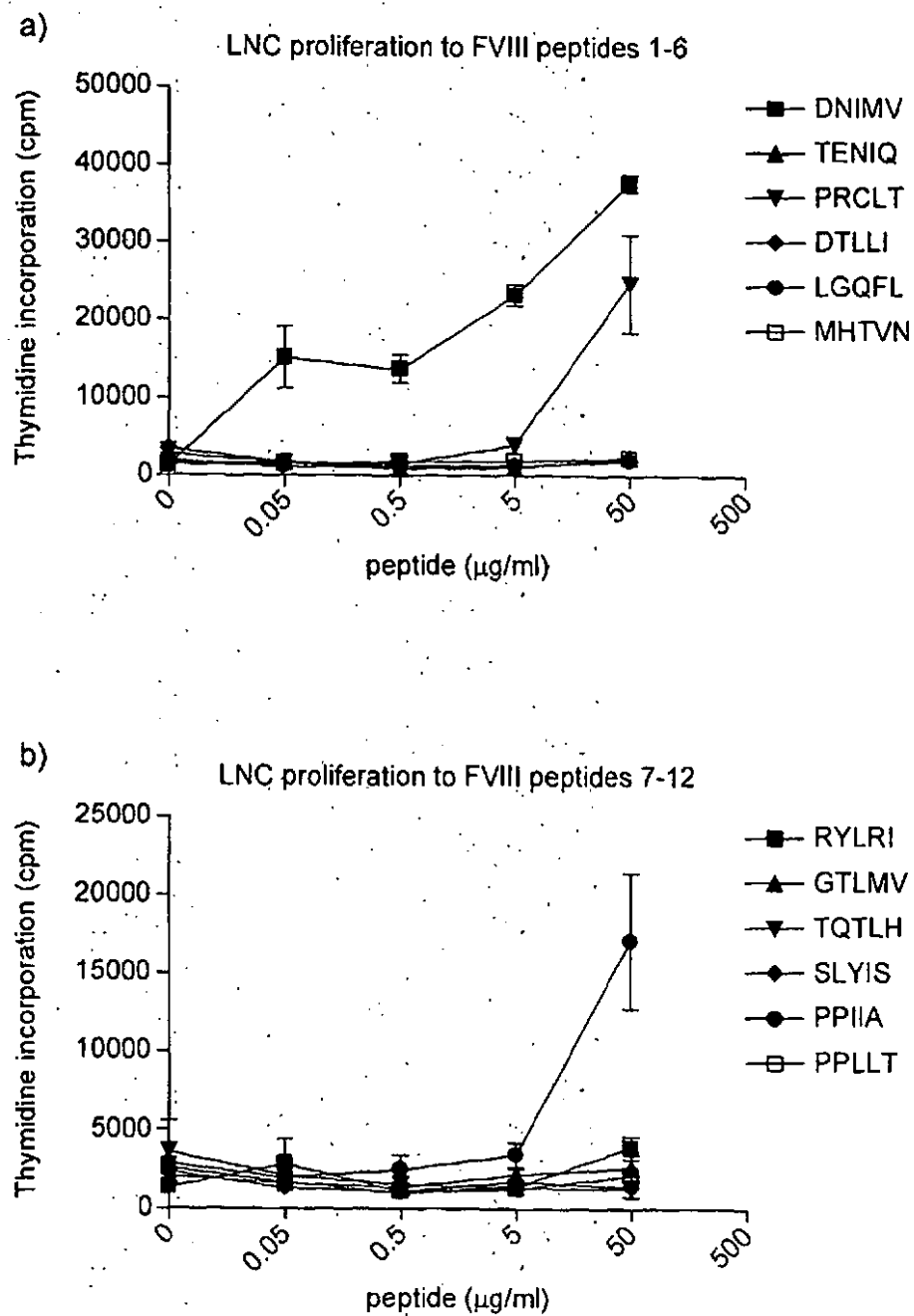


FIG. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

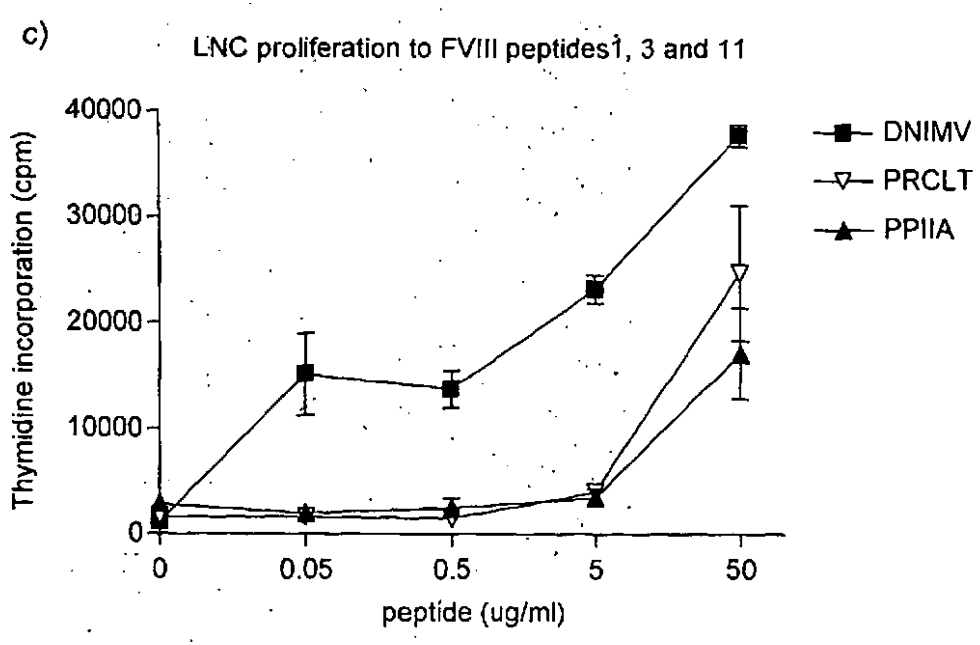


FIG. 1(cont'd)

3 / 15

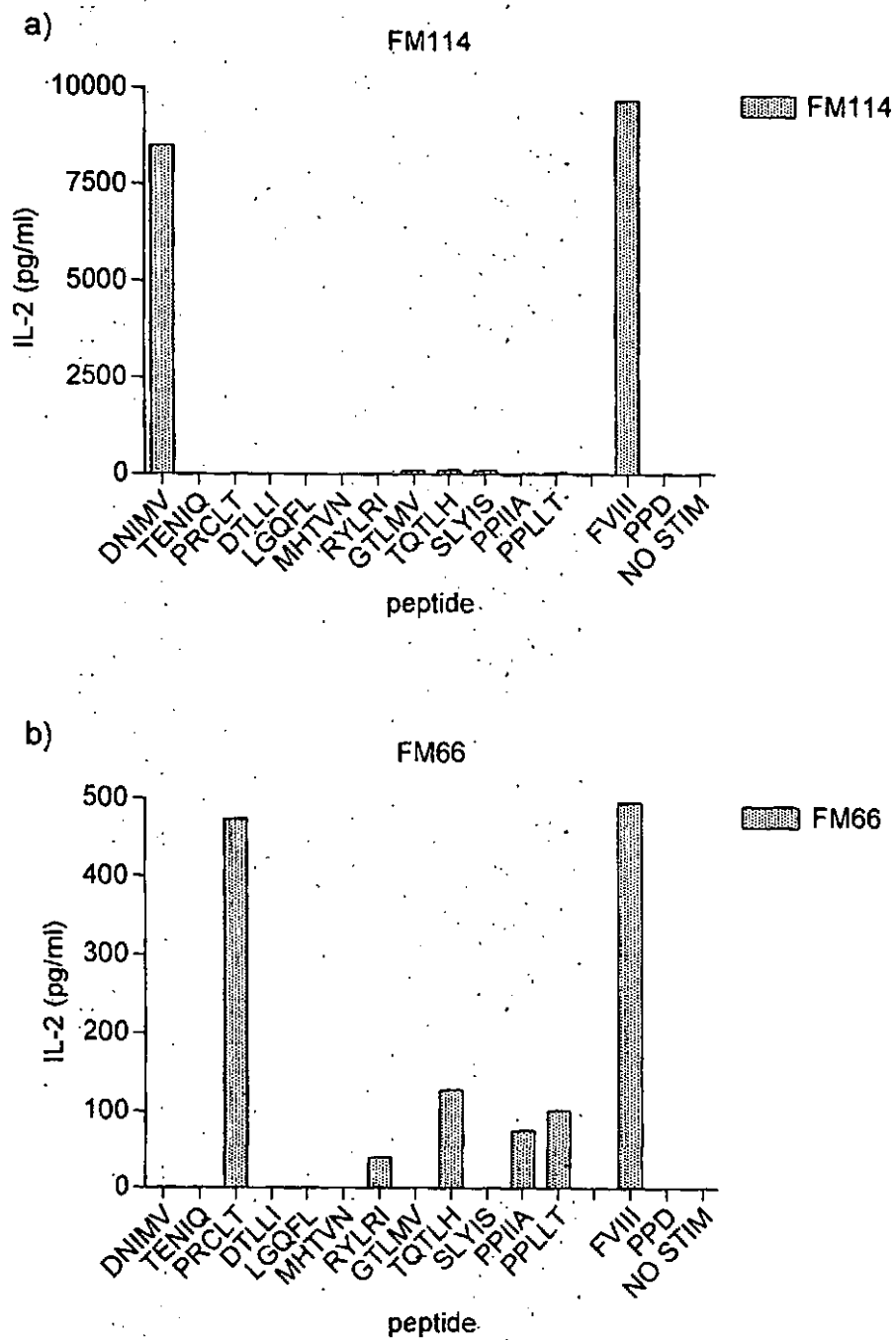


FIG. 2

4 / 15

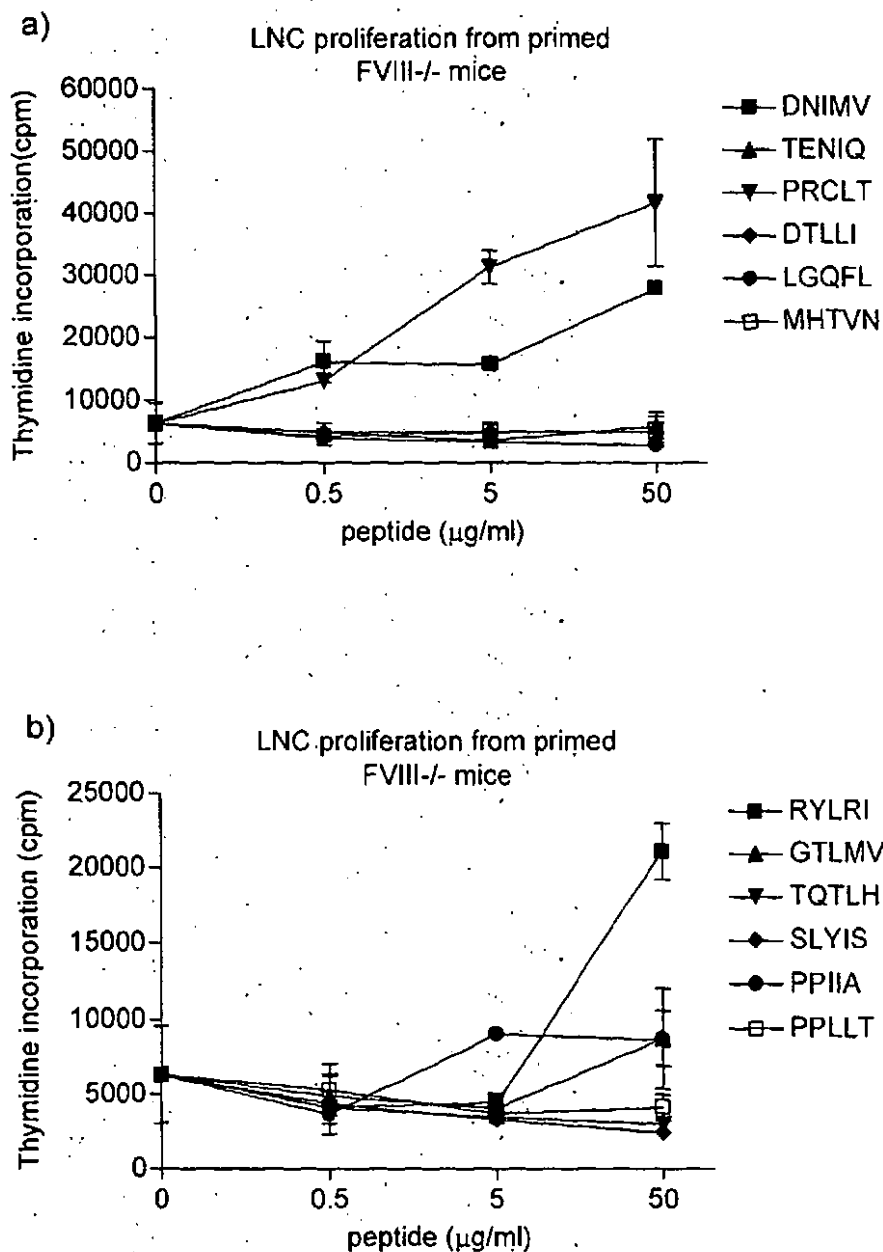


FIG. 3

5 / 15

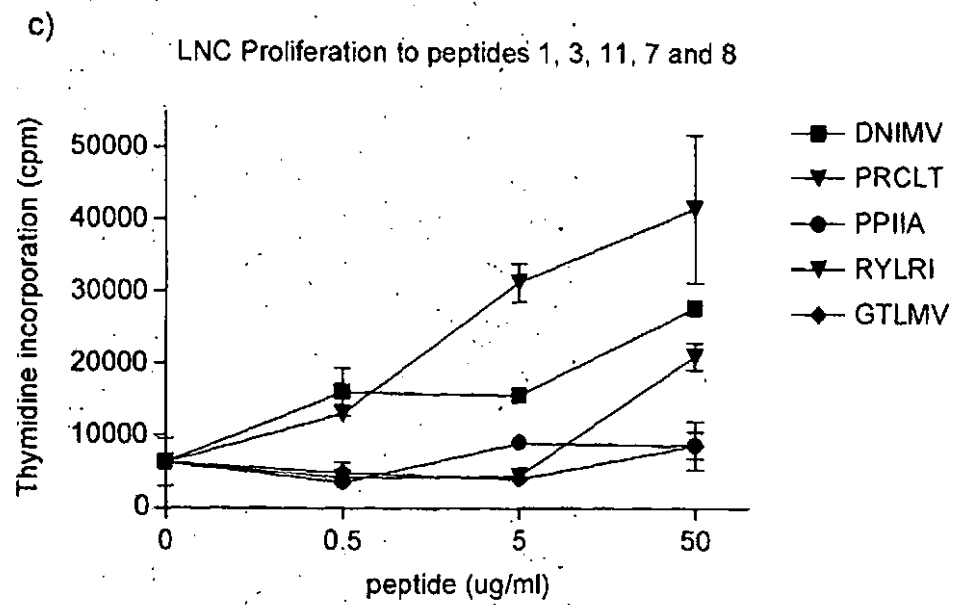


FIG. 3(cont'd)

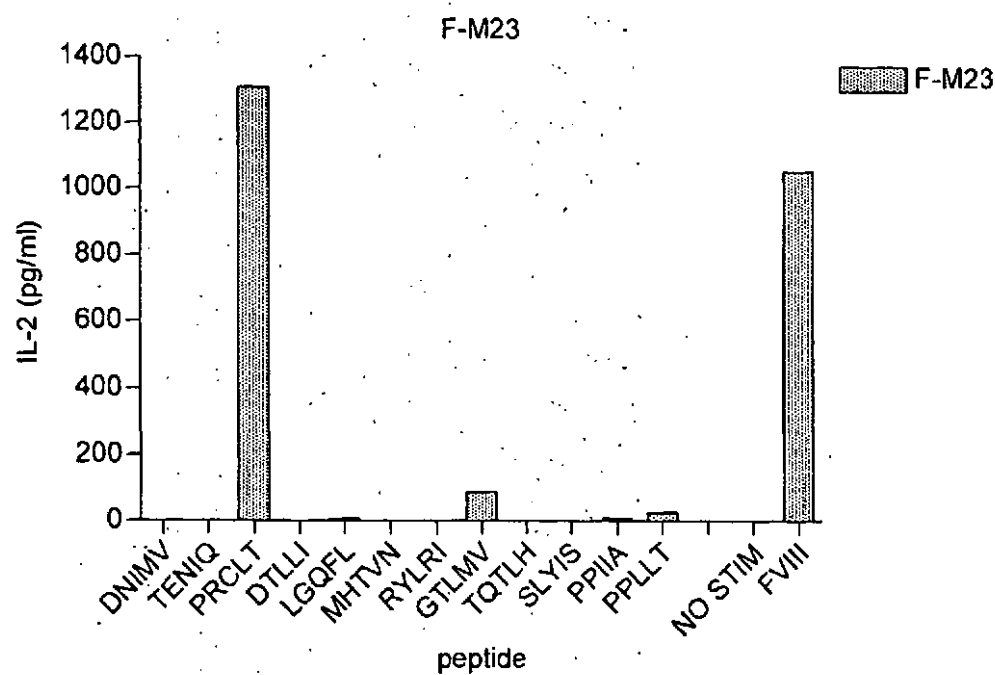
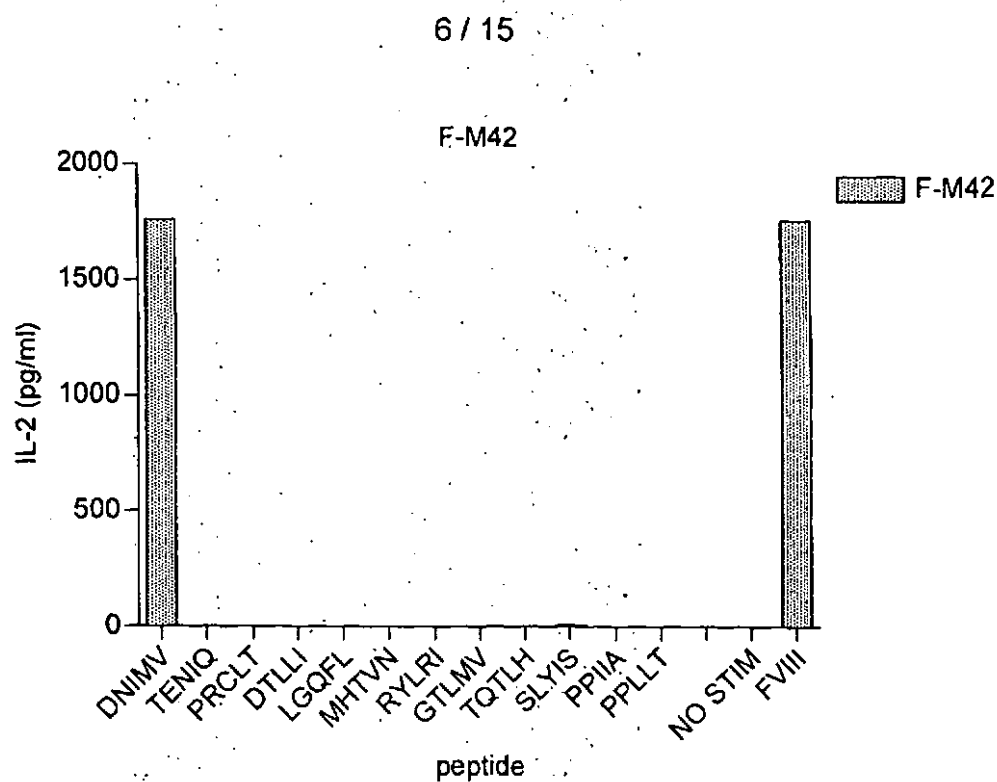


FIG. 4

7 / 15

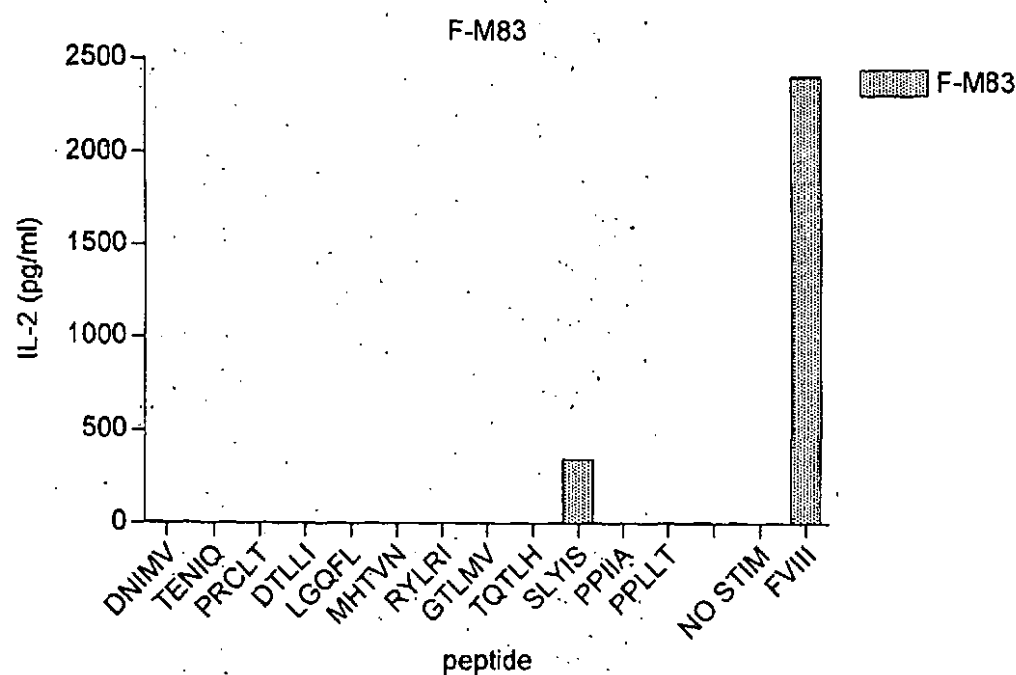
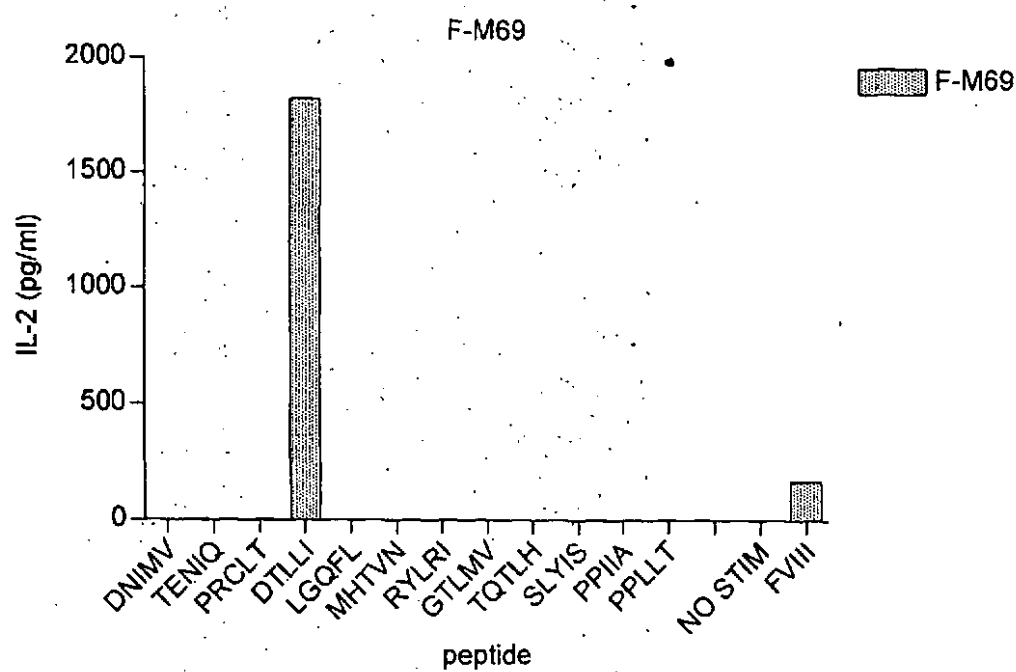


FIG. 4(cont'd)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

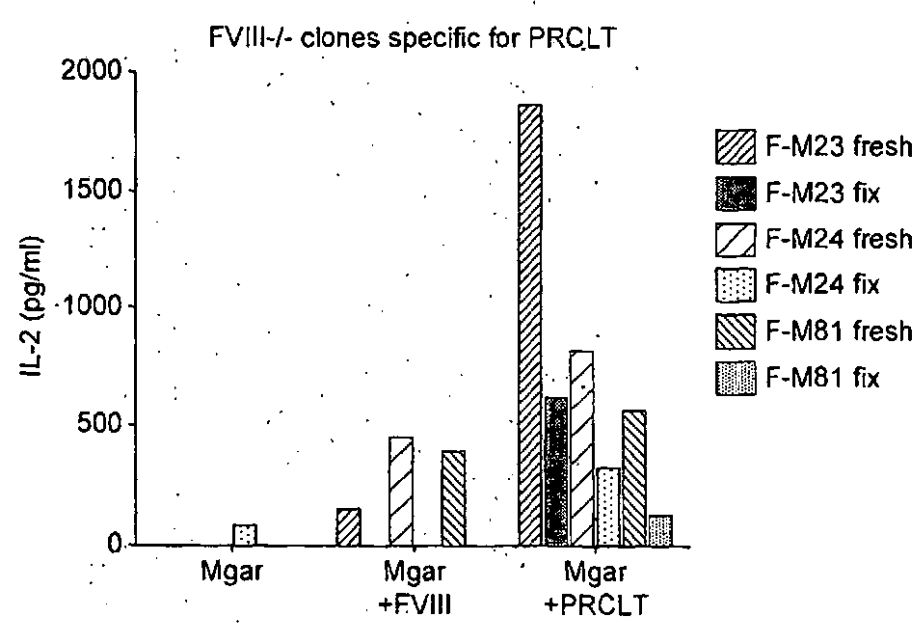
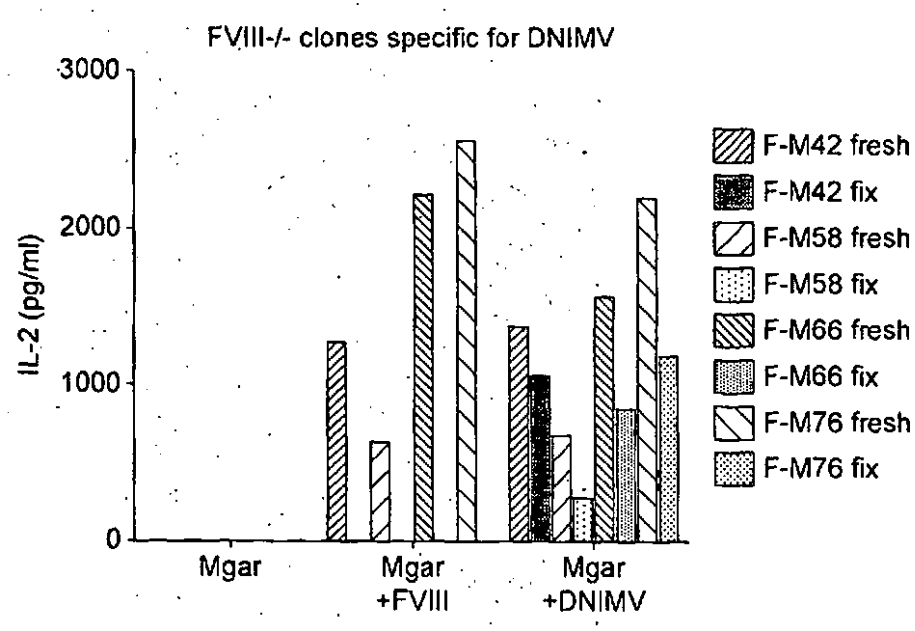


FIG. 5

9 / 15

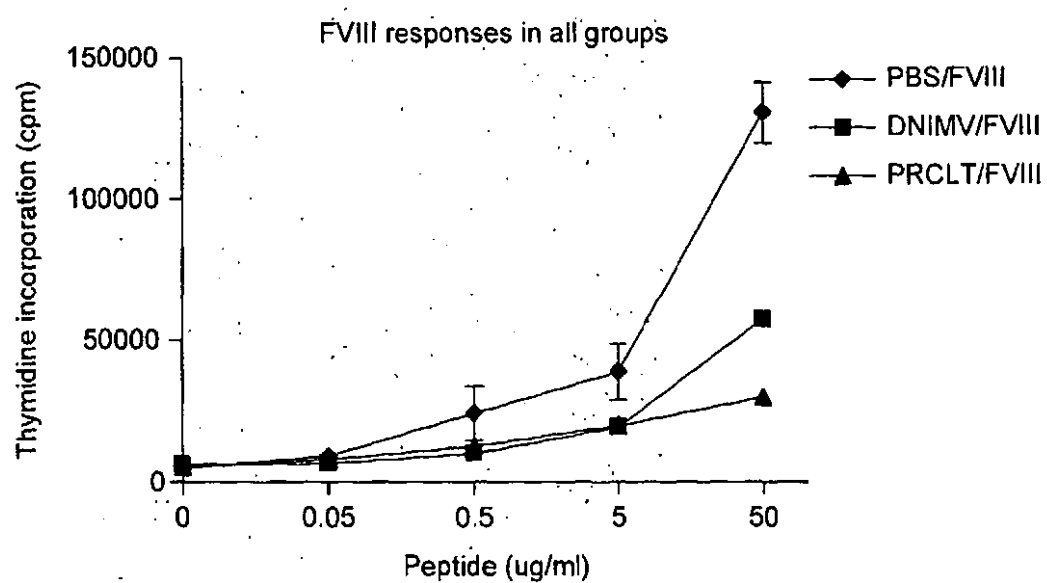


FIG. 6

10 / 15

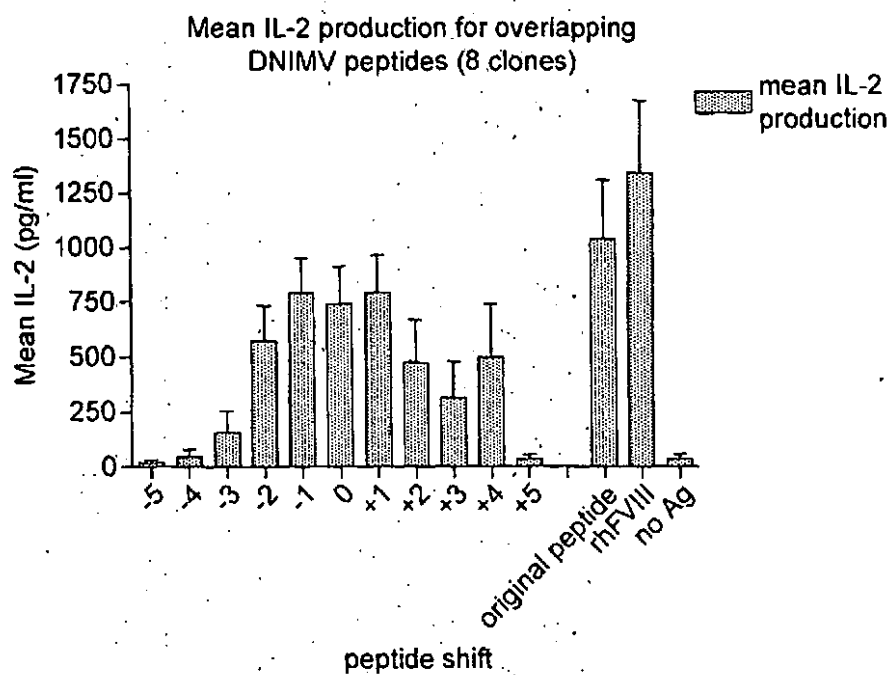


FIG. 7a

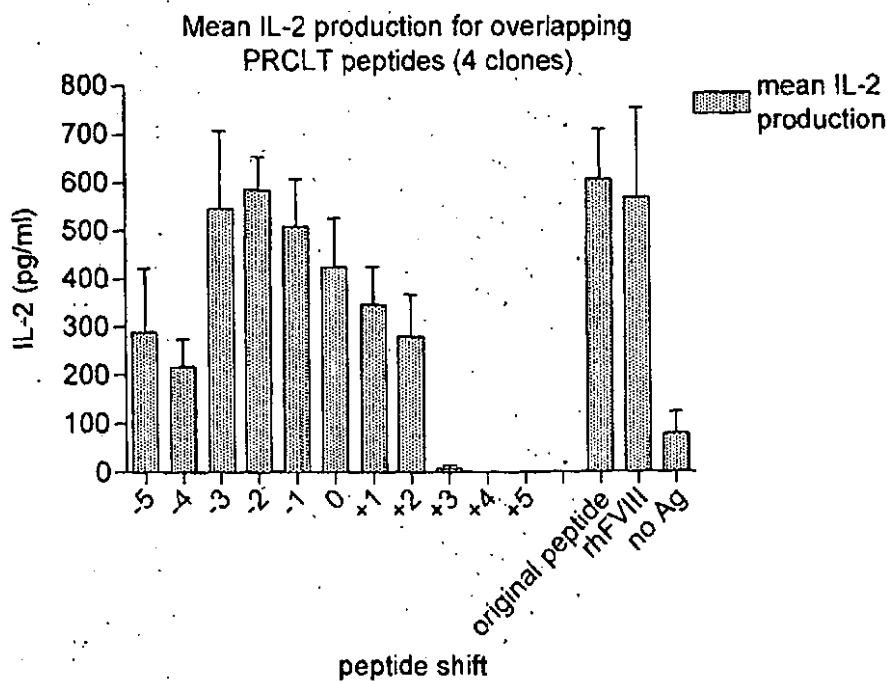


FIG. 7b

11 / 15

Mean IL-2 production for overlapping peptides
PPIIA, DTLLI, SLYIS and RYLRI

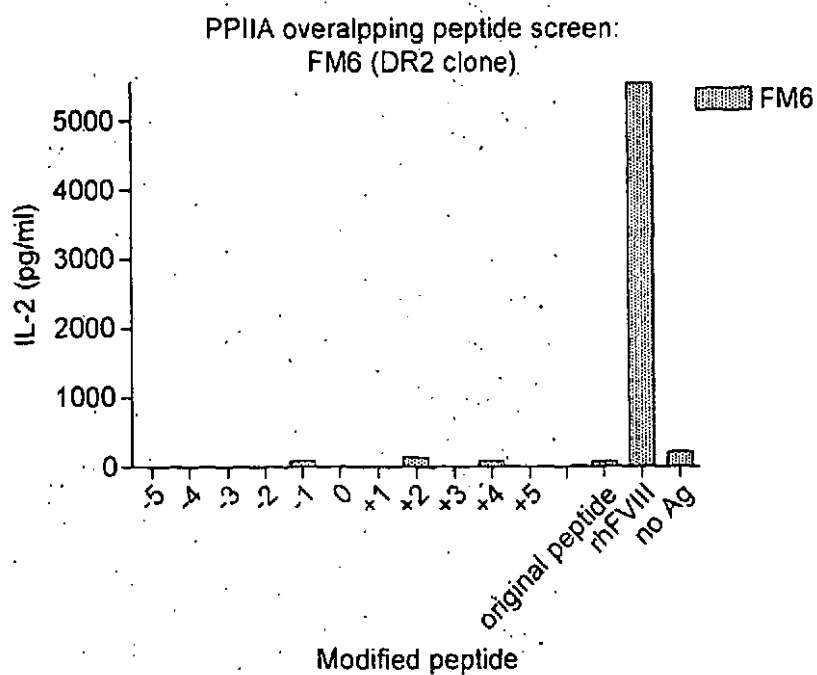
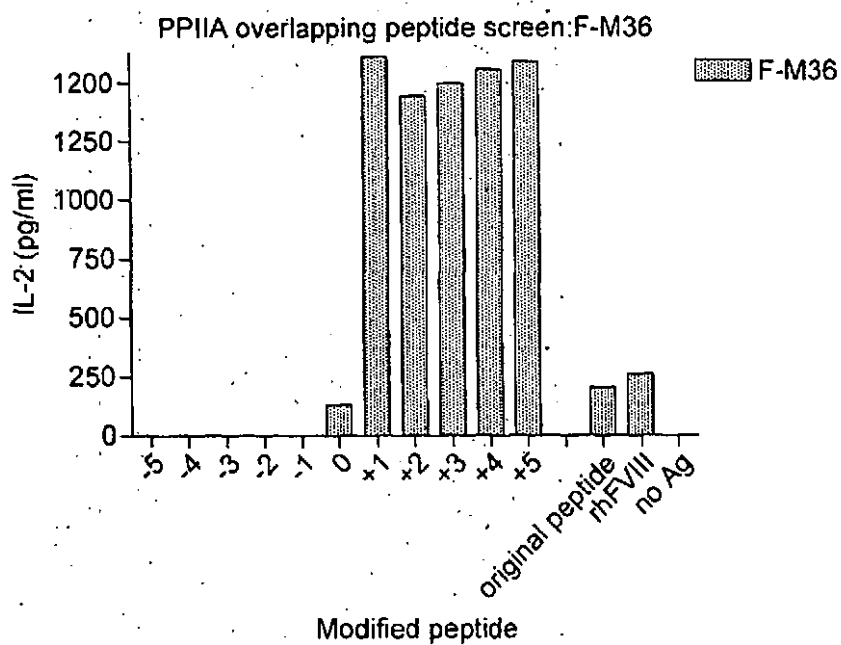


FIG. 7c

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

12 / 15

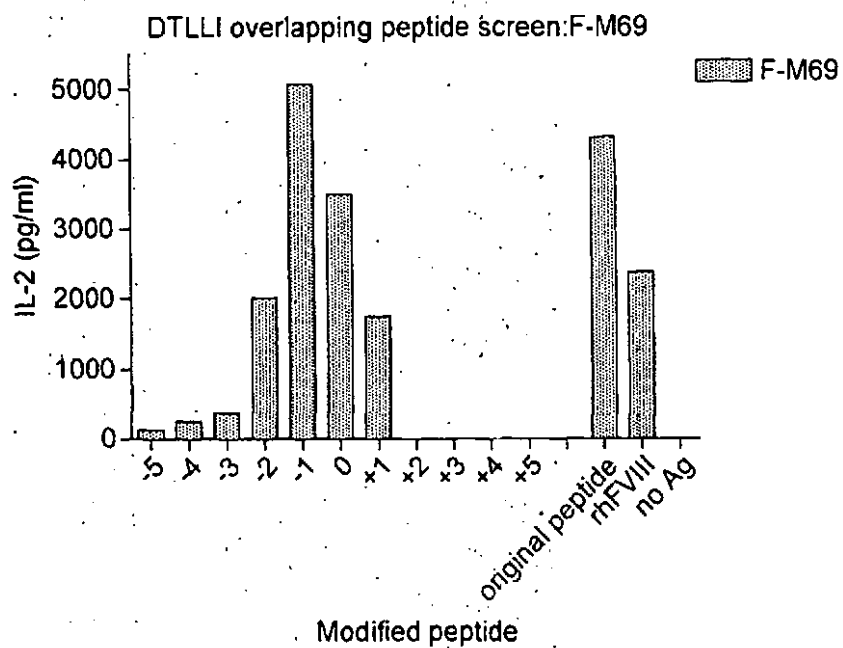
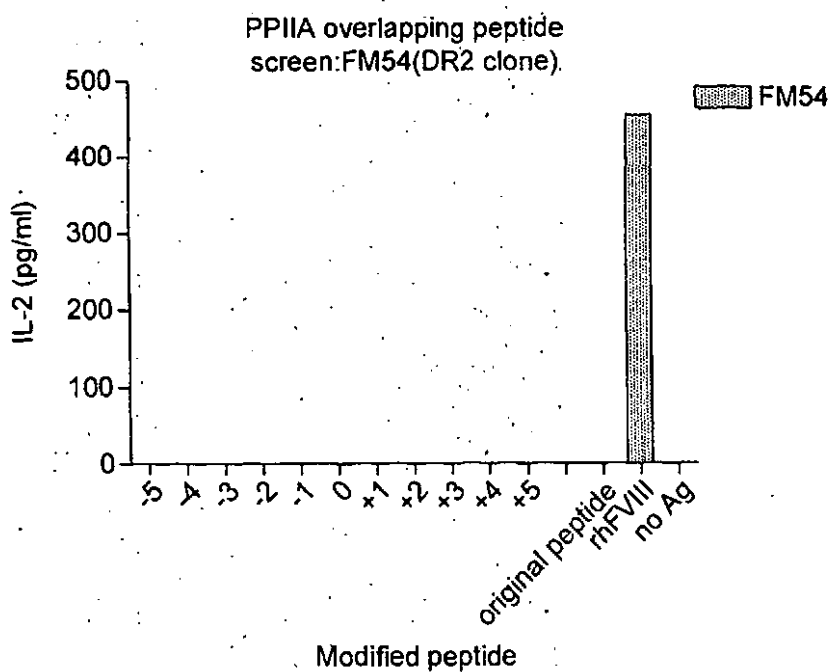


FIG. 7 (cont'd)

13 / 15

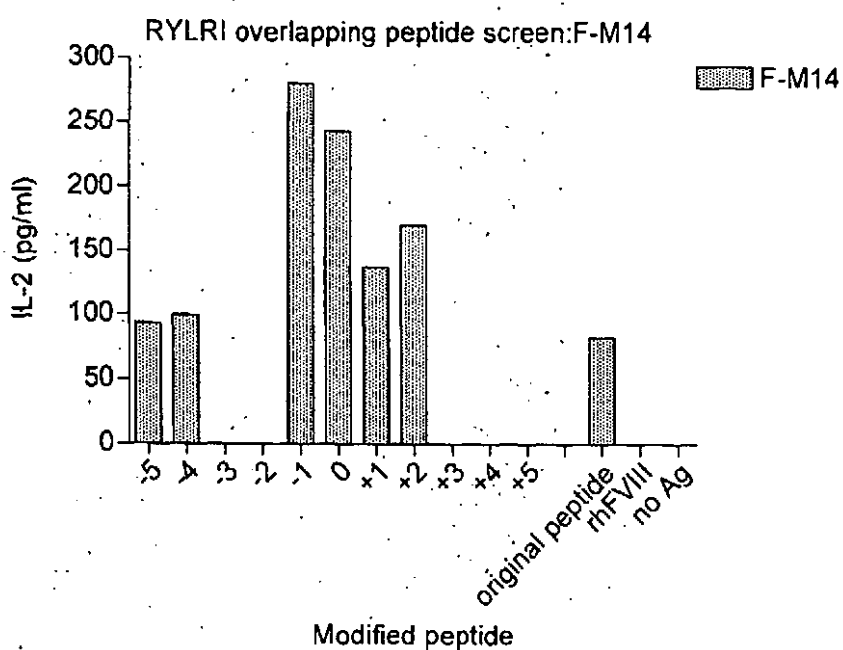
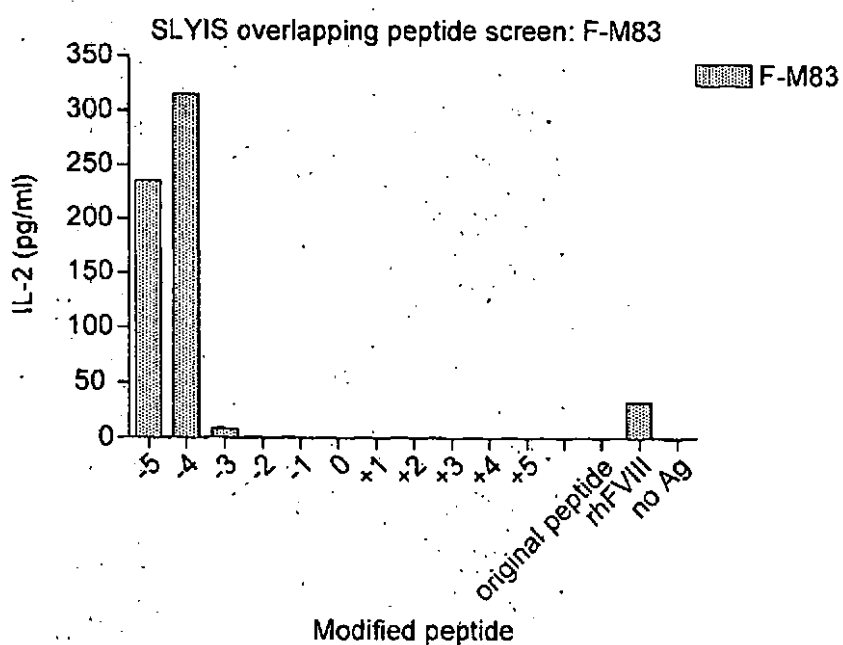


FIG. 7(cont'd).

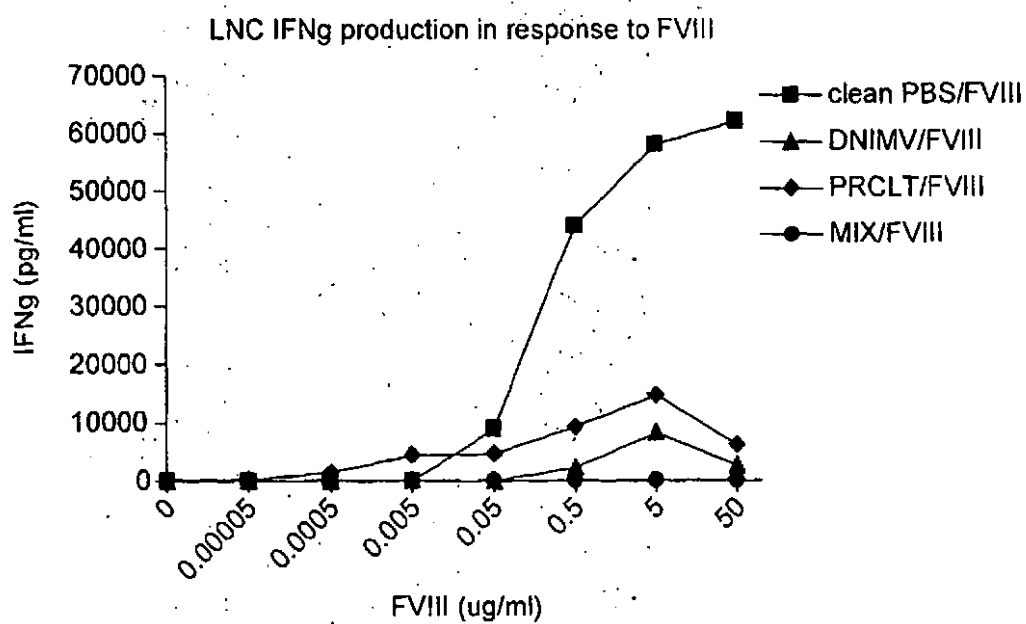


FIG. 8

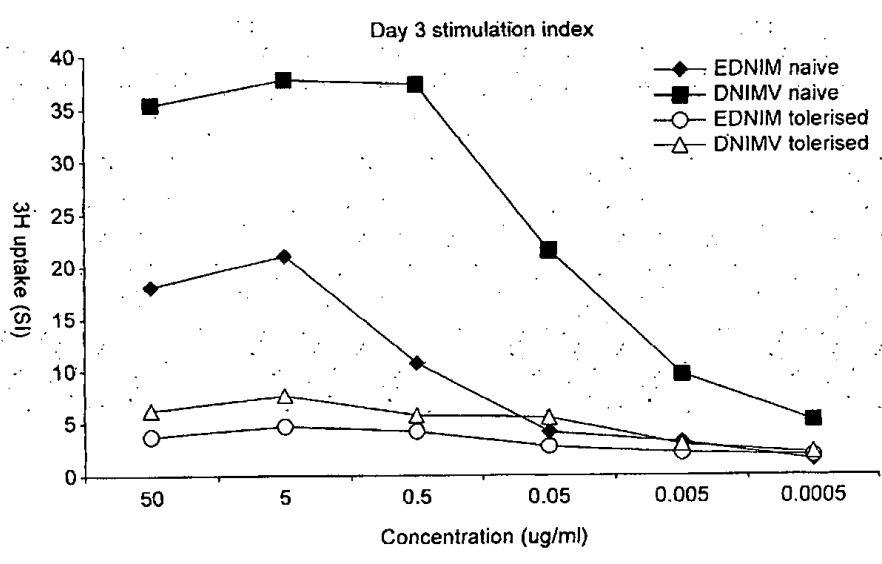


FIG. 9

MEMORIA DESCRIPTIVA
DE LA
PATENTE DE INVENCION

SOBRE:
"PÉPTIDO"

PRIORIDAD: 0908515,0 PRESENTADA: 18/05/2009

SOLICITADA POR: **APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED**

CON DOMICILIO EN: **University Gate East Park, Row Bristol BS1
5UB, Reino Unido**

APODERADA: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.**

Bogotá, D.C. _____

PÉPTIDO

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 autoinmune 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 el paciente 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 post-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:

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

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 PRCLTRYSSFVNME o DNIMVTFRNQASRPY

En una segunda realización, la presente invención proporciona 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
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYSSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

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.

En una tercera realización, la presente invención proporciona 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

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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

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.

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 y b) PRCLT

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, DNIMV 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 epítopo 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

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYYSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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 apítopos (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 apítopos 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
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHXY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

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

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYYSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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

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

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

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

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

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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,

Y=E;

$(aa)_n = \text{DNI}$

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 ((aa)_n y (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 transcritto 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 transcritto 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

TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGOFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQA

Estos péptidos ya se ha demostrado que actúan como apítopos 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 epítopos 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 epítopos 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 epítopos 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 apítopos, 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 apítopos 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 apítopo 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 RecombinateTM y KogenateTM. 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	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIARYIRLHPHXY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYYSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFPLNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

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 (1^{er} aminoácido 1788). También hay respuestas a los péptidos PRCLT (545) y PPIIA (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, 3 a PRCLT y 3 a PPIIA, si bien la respuesta a PPIIA fue más débil y menos específica. La respuesta de dos hibridomas específicos para DNIMV y PRCLT 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 y DNIMV. Hubo una débil respuesta a GTLMV y una respuesta significativa a RYLRI.

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 y PRCLT. De los 19 hibridomas específicos para el factor VIII, 10 respondieron a DNIMV, 6 a PRCLT, 1 a PPIIA, 1 a SLYIS y 1 a DTLLI. Los ejemplos de respuestas por estos hibridomas se muestran en la Figura 4.

En base a estos experimentos, resulta claro que dos péptidos DNIMV (primer número de aminoácido 1788) y PRCLT (primer aminoácido 545) constituyen los

epítopos 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 y PRCLT, 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, PRCLT 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 o PRCLT 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 y PRCLT 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 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.

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 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 modificado (denominado "tolerizado" en la figura 9). Luego, los ratones fueron inmunizados con DNIMV en CFA y 10 días más tarde se recolectaron nódulos linfáticos drenantes y se estimularon *in vitro* con DNIMV o EDNIMV. La Figura 9 muestra los resultados para las respuestas de ratones sin tratamiento o tolerizados estimulados con DNIMV o EDNIMV *in vitro*.

Los resultados demuestran que EDNIMV es capaz de recordar una respuesta inmune de ratones inmunizados con DNIMV. Adicionalmente, demuestran muy claramente que los ratones tolerizados con EDNIMV no pueden montar una respuesta inmune a DNIMV *in vivo* según lo revelado por la falta de respuesta a DNIMV o EDNIMV *in vitro* después del cebado ("priming") con DNIMV 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 para demostrar que EDNIMV 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 nùll 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, PRCLT o PPIIA 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, PRCLT o con una combinación de DNIMV y PRCLT 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 mqieltstcfl lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdg gelpvdaifp prvpksfpfn
61 tsvvykktlf vefldhlfni akprppwmgf lgptiqaevy dtvvtlknm ashpvslhav
121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
241 aasarawpkm htvngyvnrs lpgligchrk svywhvigmg tpevhsifl egthflvrnh
301 rqaaleispi tfltaqtllm dlqqlfllch issqhhdgme ayvkvdscope epqlrmknne
361 eaedydddlr dsemdivrfd ddnspsfqi rsvakkhpkv wvhyiaaeew dwdyaplva
421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdeftktrea iqhesgilgp llygevgdtl
481 liifknqasr pyniypggit dvrplysrll pkgvkhkldf pilpgeifky kwvtvvedgp
541 tkdsprcltr yysfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilsvfde
601 nrswyiteni qrlpnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
661 igaqtdflsv ffsygtfkhk mvyedtltr pfsgetvms menpglwilg chnsdfrnrg
721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknaieprs fsqsrhpst rqqqfnatti
781 pendiektdp wfahrtmpmk iqnvssdli mltrqsptph glsldlqea kyetfsddps
841 pgaidsnnsi semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrlne klgttaatel kklidkvsst
901 snnlistips dnlaagdnt sslgppsmpv hydsqldtl fgkksplte sggplslsee
961 nndskilesq lmsqesswg knvsstesgr lfkgkrahgp alltkdnalf kvsisllktn
1021 ktsnnsatnr kthidgpsll lenspsvwqn ilesdtefkf vtplihdrml mdknatair
1081 nhmsnktss knmemvqqk egpipdaqr pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nlfseknkv vkggeftkdv glkemvfpss nrlftnldn
1201 lhennthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknlfls trqnvegsyd
1261 gayapvlqdf rslndstnr kkhtafrskk geeenleglg nqtqgiveky acttrispnt
1321 sqqnfvtrsr kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
1381 kgaitqspls dcltrshsp qanrspipia kvssfsirp iyltrvlfqd nsshlpaaay
1441 rkkdsgvqes shllqgakn nlsalitle mtgdqrevgs lqtsatnsvt ykkventvlp
1501 kpdipktsgk vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldv egslqgteg aikwneanrp
1561 gkvplfrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqr terlcsqnpp vlkrhqreit rttlqsdqee
1681 idyddtisve mkkedfdiye edenqsprsf qkkrthyfia averlwdygm sssphvlrnr
1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtrnqasr
1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
1861 dlekdvhsgl igpllvchtn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
1921 pniqmedpt fkenyrthai ngymdtlpg lvmaqdqrir wyllsmgsne nihsihfsg
1981 vftvrkkeey kmalylnypg vftvemlps kagiwrvecl igehlhagms tflivysnkc
2041 qtplgmasgh irdfqitasg qygqwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdlapmii
2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvtqgvksl ltsmyvkefi
2281 isssqdghqw tiffqngkvk vfqgnqdsft pvnsldppl ltrylrihpq swvhqialrm
2341 evlgceaqdl y

Paneles de péptidos superpuestos preparados en el Ejemplo 7

Conjunto superpuesto para DTLLIFKNQASRPY

1.	473-488	YGEVGD TLLIFKNQ
2.	474-489	GEVGD TLLIFKNQA
3.	475-490	EVGD TLLIFKNQAS
4.	476-491	VGD TLLIFKNQASR
5.	477-492	GD TLLIFKNQASRP
6.	478-493	DTLLIFKNQASRPY
7.	479-494	TLLIFKNQASRPYN
8.	480-495	LLIFKNQASRPYNI
9.	481-496	LIFKNQASRPYNIY
10.	482-497	IFKNQASRPYNIYP
11.	483-498	IFKNQASRPYNIYPH

Conjunto superpuesto para PRCLTRYSSFVNME

1.	540-554	PTKSDPRCLTRYSS
2.	541-555	TKSDPRCLTRYSSF
3.	542-556	KSDPRCLTRYSSFV
4.	543-557	SDPRCLTRYSSFVN
5.	544-558	DPRCLTRYSSFVNM
6.	545-559	PRCLTRYSSFVNME
7.	546-560	RCLTRYSSFVNMER
8.	547-561	CLTRYSSFVNMERD
9.	548-562	LTRYSSFVNMERDL
10.	549-563	TRYSSFVNMERDLA
11.	550-564	RYSSFVNMERDLAS

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	VTFRNQASRPYSFY
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 PPIARYIRLHPHY

1. 2156-2170	HNIFNPPIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIARYIRLHPT
5. 2160-2174	NPPPIARYIRLHPH
6. 2161-2175	PPPIARYIRLHPHY
7. 2162-2176	PPIARYIRLHPHYS
8. 2163-2177	PIARYIRLHPHYSI
9. 2164-2178	IARYIRLHPHYSIR
10. 2165-2179	ARYIRLHPHYSIRS
11. 2166-2180	RYIRLHPHYSIRST

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

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 comprende una de las siguientes secuencias derivadas de FVIII:

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHXY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGOFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

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 clase II de MHC sin procesamiento posterior de antígenos y de ser reconocido por un linfocito T específico para el factor VIII.

2. 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
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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.

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende la secuencia XDNIMVTFRNQAS.

4. 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

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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.

5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 4, el cual comprende la secuencia:

YDNIMVTFRNQASZ

6. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde Y es un aminoácido cargado positivamente y Z es un aminoácido cargado negativamente.

7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 4, 5 o 6, donde Z es K o R.

8. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde X o Y es D o E.

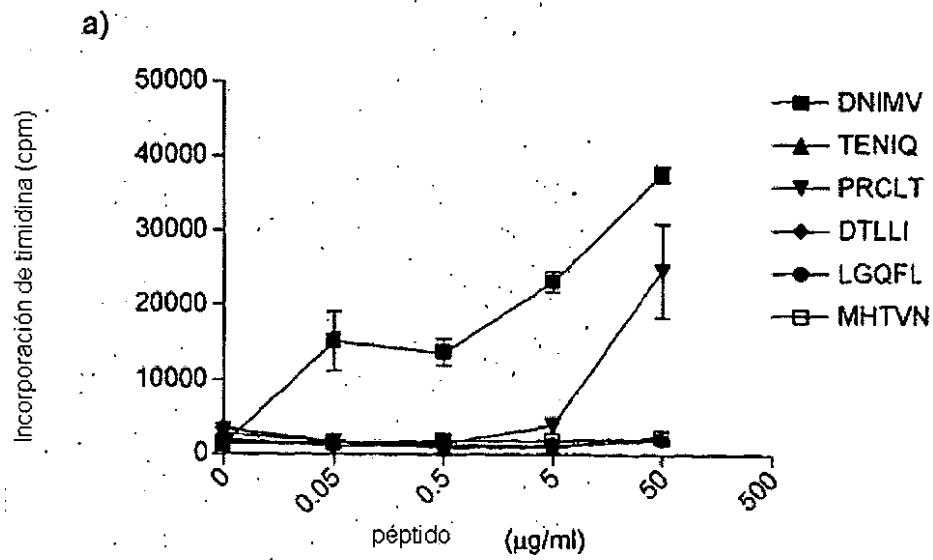
9. Un péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, el cual comprende la secuencia EDNIMVTFRNQASR.
10. Un péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente el cual consiste en la secuencia EDNIMVTFRNQASR.
11. Una composición que comprende una pluralidad de péptidos, incluyendo uno o más péptidos de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
12. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una composición de acuerdo con la reivindicación 11, para utilizar en la supresión o prevención de la producción de anticuerpos inhibidores del factor VIII *in vivo*.
13. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la manufactura de un medicamento para suprimir o prevenir la producción de anticuerpos inhibidores del factor VIII *in vivo*.
14. Un método para suprimir o prevenir la producción de anticuerpos inhibidores del factor VIII en un sujeto, el cual comprende el paso de administración de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una composición de acuerdo con la reivindicación 11, al sujeto.
15. Un método para tratar la hemofilia en un sujeto el cual comprende el paso de administración de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una composición de acuerdo con la reivindicación 11, al sujeto.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde el sujeto tiene hemofilia A, y está siendo sometido a, o está a punto de ser sometido a, terapia de reemplazo del factor VIII.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde el sujeto tiene, o corre el riesgo de contraer, hemofilia adquirida.
18. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde el sujeto es HLA-DR2.

RESUMEN**PÉPTIDOS**

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.

1 / 15

Proliferación de LNC a péptidos de FVIII 1-6



Proliferación de LNC a péptidos de FVIII 7-12

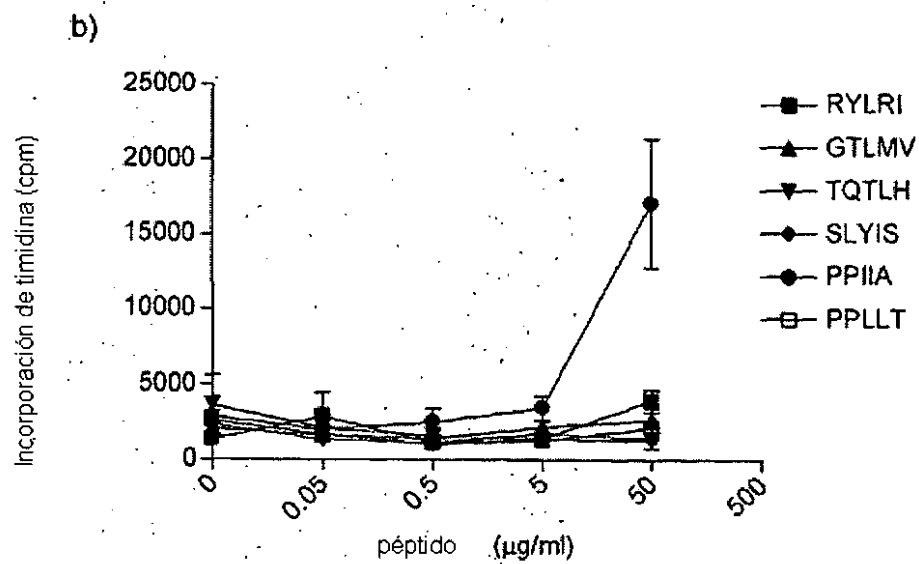


FIG. 1

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

2 / 15

Proliferación de LNC a péptidos de FVIII 1, 3 y 11

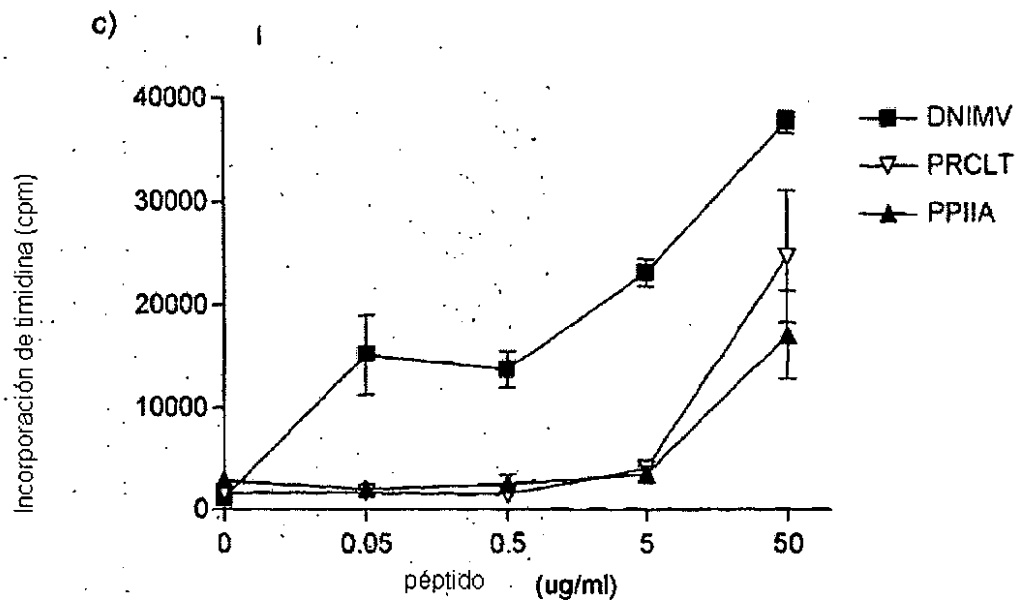


FIG. 1(cont.)

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

3 / 15

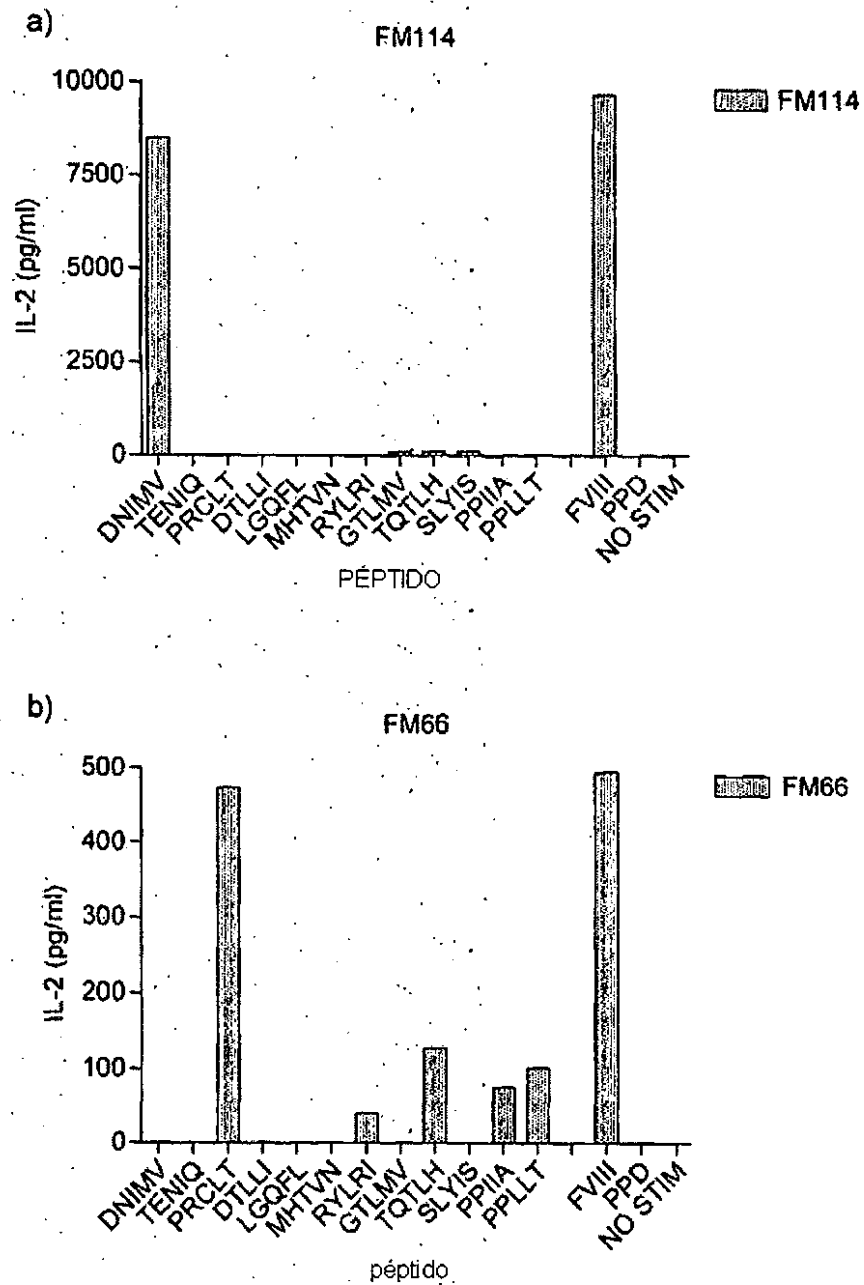


FIG. 2

4 / 15

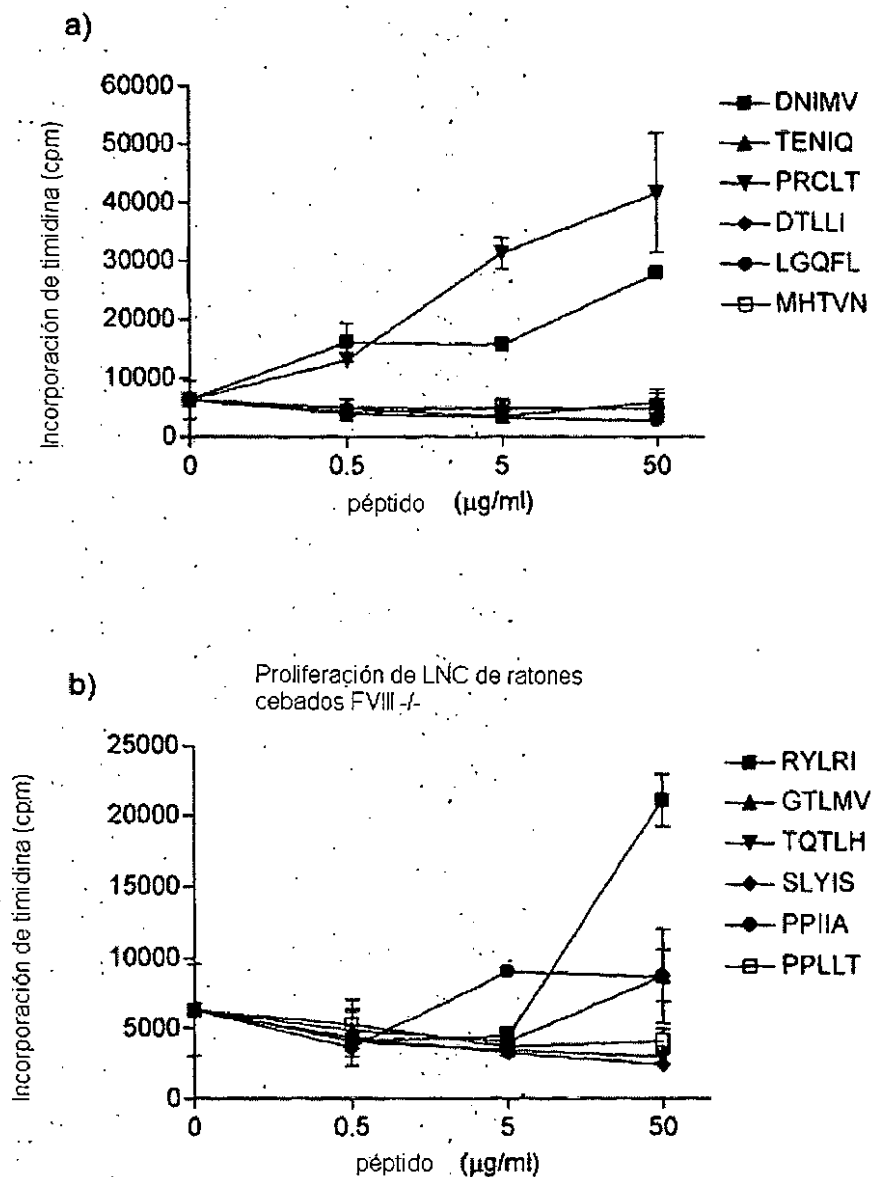
Proliferación de LNC de ratones
cegados FVIII -/-

FIG. 3

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

8 / 15

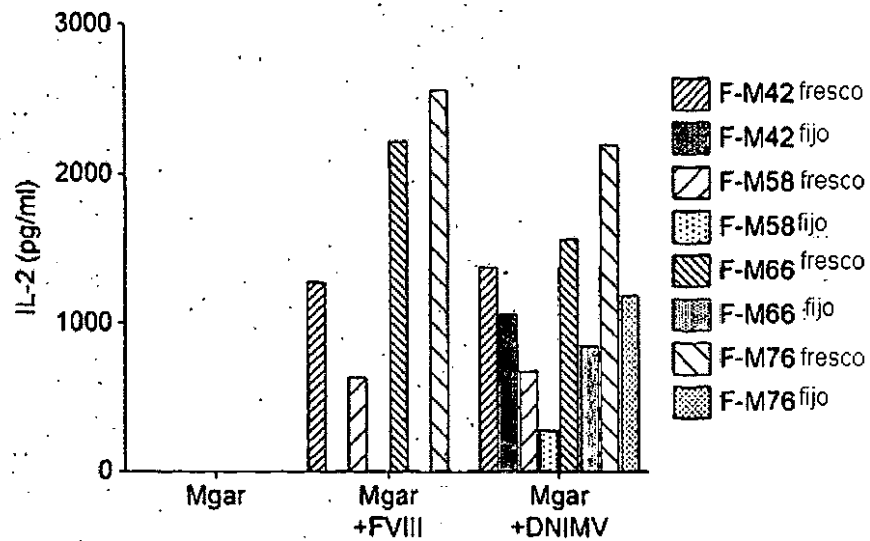
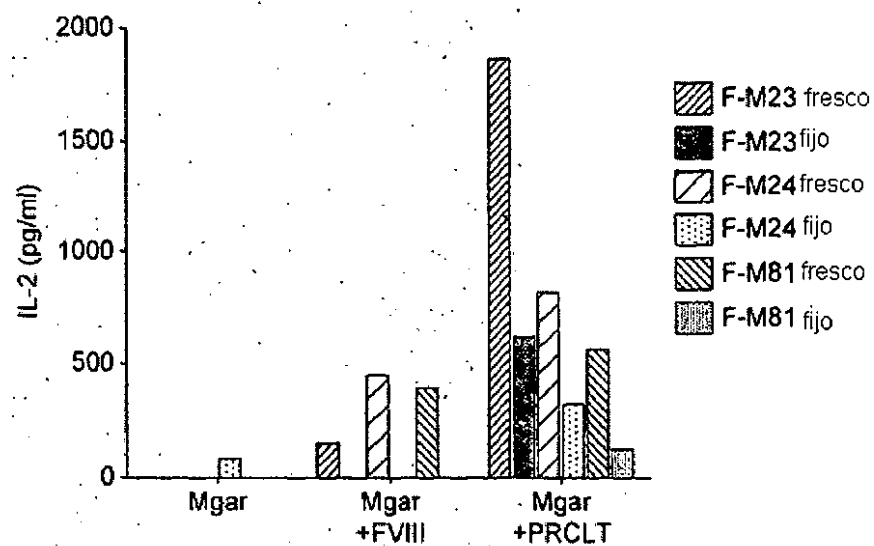
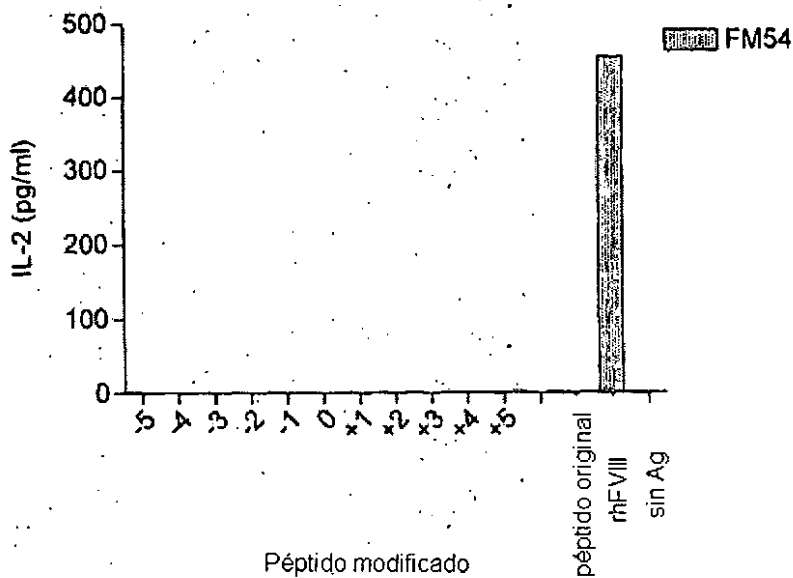
clones de FVIII^{-/-} específicos para DNIMVclones de FVIII^{-/-} específicos para PRCLT

FIG. 5

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

selección de péptido superpuesto
PPIIA: FM54 (clon DR2)



Selección de péptido superpuesto DTLLI: F-M69

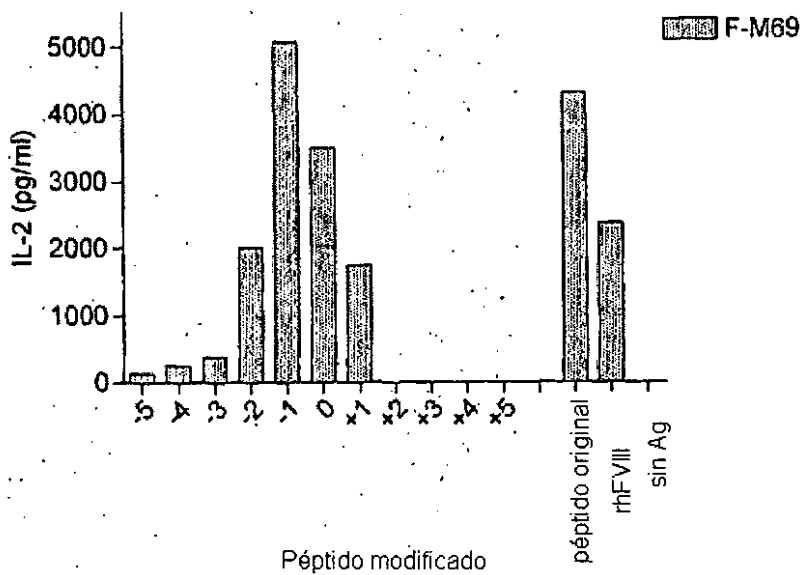


FIG. 7 (cont.)

Producción de IFNg de LNC como respuesta a FVIII

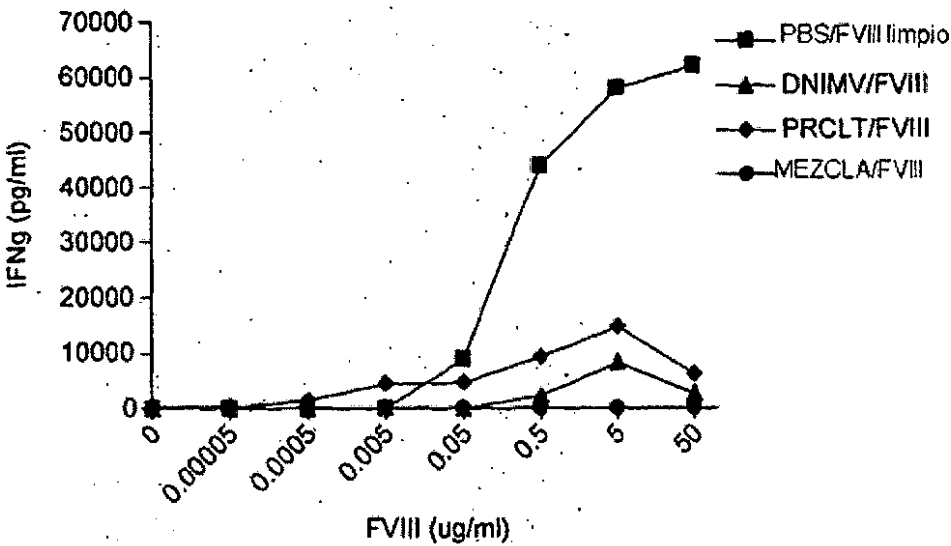


FIG. 8

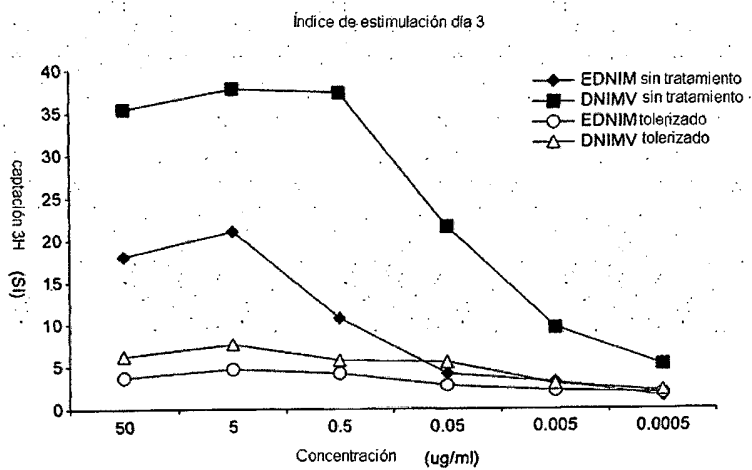


FIG. 9

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS			
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____					
(21) N° de solicitud:			(22) Fecha de solicitud:		
(51) Clasificación Internacional :					
(71) Solicitante(s) APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED					
(72) Inventor(es) WRAITH, David					
(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO					
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33) País
		0908515,0		18/05/2009	GB
(85) Fecha inicio fase nacional:				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 25/11/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 17/05/2010				N° publicación: WO 2010/133834 A2	
No. de solicitud PCT/GB2010/000997					
(54) Título: PÉPTIDO					

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad 32) Fecha (33) Pais 0908515,0 18/05/2009 GB		(51) Int.Cl.: (71) Solicitante(s) APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED (72) Inventor(es) WRAITH, David (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 17/05/2010 N° de solicitud PCT/GB2010/000997		(87) Publicación internacional Fecha: 25/11/2010 N° publicación: WO 2010/133834 A2	
(54) Título: PÉPTIDO			

Reivindicación(es):

1. Un péptido que comprende una de las siguientes secuencias derivadas de FVIII:

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYSSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

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 clase II de MHC sin procesamiento posterior de antígenos y de ser reconocido por un linfocito T específico para el factor VIII.

2. 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

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYSSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

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.

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende la secuencia

XDNIIMVTFRNQAS.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 112177

Bogotá D.C., Noviembre 17 de 2011 - 14:26:58

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387647610	17/11/2011	787.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
8	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	216.000.00
				\$216.000.00

SON: **DOSCIENTOS DIECISEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-156774- -00000-0000
Fecha: 2011-11-17 14:35:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 143



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156774- -00000-0000

Fecha: 2011-11-17 14:35:39
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 143

:S

PATENTE DE INVENCION

☐

MODELO DE UTILIDAD

☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

PATENTE DE INVENCION PCT

☒

MODELO DE UTILIDAD PCT

☐Art. 33 Decisión 486/00
Circular Única☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☒

Incompleta

☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazo

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐