

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201590927** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.10.30

(22) Дата подачи заявки
2013.11.11

(51) Int. Cl. **C07K 14/755** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)

(54) ПЕПТИДЫ

(31) 1220328.7; 1316660.8

(32) 2012.11.12; 2013.09.19

(33) GB

(86) PCT/IB2013/060060

(87) WO 2014/072958 2014.05.15

(71) Заявитель:
ЭПИТОП ИНТЕРНЭШНЛ НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Рэйт Дэвид, Стритер Хитер (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к пептидам, которые частично могут быть получены из FVIII, которые способны к связыванию с молекулой МНС класса II без дополнительного антигенного процессинга и подверганию распознаванию специфичной к фактору VIII Т-клеткой. В частности, настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим последовательность DNIMVTFRNQASRPY или PRCLTRYSSFVNME с модификациями на N- и C-концах. Настоящее изобретение также относится к применению такого пептида для предотвращения или супрессии образования ингибирующего антитела при гемофилии А и/или приобретенной гемофилии.

A1

201590927

201590927

A1

ПЕПТИДЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к пептидам, по меньшей мере часть которых может быть получена из фактора VIII (FVIII). Пептиды могут быть использованы для снижения или предотвращения образования ингибирующего фактор VIII антитела, например в лечении гемофилии А и приобретенной гемофилии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ

ГЕМОФИЛИЯ

Гемофилия относится к группе наследственных заболеваний крови, которые включают в себя гемофилию А, гемофилию В (болезнь Кристмаса) и болезнь Виллебранда.

При гемофилии крови способность свертываться сильно снижена из-за того, что необходимый фактор свертывания частично или полностью отсутствует, приводя к повышенному времени кровотечения.

Гемофилия А является недостатком фактора свертывания VIII, тогда как Гемофилия В является недостатком фактора свертывания IX. При обоих заболеваниях дефектный ген находится на X-хромосоме, так что эти состояния являются X-связанными. Гемофилия А встречается в пять раз чаще, чем гемофилия В.

Гемофилия является пожизненным наследственным генетическим заболеванием, которое оказывает воздействие на женских особей в качестве носителей и мужских особей, которые наследуют заболевание. Приблизительно треть новых диагнозов происходит, когда не имеет место предшествующий семейный анамнез. Заболевание проявляется во всем мире во всех расовых группах. Приблизительно 6000 человек поражены гемофилией в СК.

Больные гемофилией подвержены кровотечению в течение более длительного периода после повреждения. Внешние повреждения, такие как порезы и царапины, обычно не вызывают серьезных проблем: часто возможно остановить кровотечение применением некоторого давления и покрыванием поврежденной области (например, пластырем).

Главной проблемой является внутреннее кровотечение в

суставы, мышцы и мягкие ткани, что может происходить самопроизвольно. Внутреннее кровотечение, например, кровоизлияния в мозг, очень сложно контролировать и оно может быть смертельным. Повторяющееся кровотечение в суставы вызывает острую боль и может вызывать артрит и/или долговременное разрушение суставов, приводящее к нетрудоспособности.

Лечение гемофилии обычно осуществляют замещением недостающего фактора свертывания. При слабой или умеренной гемофилии инъекции могут быть введены в то время, когда происходит кровотечение (лечение по требованию). Однако при сильной гемофилии регулярные профилактические инъекции вводят для содействия свертыванию крови и минимизации вероятности долговременного разрушения сустава.

Потенциально серьезным осложнением при терапии с замещением коагулирующего фактора для гемофилии А является развитие антител, которые нейтрализуют прокоагулирующую функцию фактора VIII. Ингибиторы фактора VIII встречаются у примерно 25% больных сильной гемофилией А. Так как пациенты с врожденной гемофилией А могут являться генетически дефицитными по FVIII, синтез ингибиторов является аллоиммунным ответом на чужеродный белок, вводимый для предотвращения или лечения случаев кровотечения.

T-клетки CD4+ играют центральную роль в иммунном ответе на FVIII. После поглощения антигенпредставляющими клетками (АПК), FVIII подвергается протеолитической деградации на пептидные фрагменты (Reding et al (2006) Haemophilia 12(supp 6) 30-36). Эти пептиды представлены на поверхности АПК в ассоциации молекулами МНС класса II. Этот комплекс затем распознается рецептором CD4+ T-клеток, специфичным к FVIII. При наличии подходящих ко-стимулирующих сигналов это распознавание в конечном счете вызывает направление клетками CD4+ синтеза антител B-клетками.

Частота возникновения образования ингибитора первоначально возрастает с числом обработок фактором VIII, но, как оказывается, она выходит на плато после 50-100 дней воздействия. Образование ингибитора происходит намного чаще при

сильной гемофилии, чем при умеренной или слабой болезни и некоторых молекулярных дефектах, наиболее вероятно, что большие делеции и бессмысленные мутации в легкой цепи фактора VIII являются предрасполагающими к образованию ингибитора. Такие параметры, как концентрация, тип (очищенный или рекомбинантный) фактора замещения и история лечения, могут также оказывать воздействие на вероятность выработки антитела.

Контроль течения заболевания у пациентов с гемофилией с ингибиторами должен быть непрерывным. Индукция иммунной толерантности (ИИТ) с применением технологии десенсибилизации является успешной для некоторых пациентов с аллоантителами против фактора VIII. Для этого терапевтического подхода требуется непрерывное подвергание терапии с замещением фактора, так что это является долговременной стратегией.

Хотя ИИТ может являться успешной, значительная доля (приблизительно 30%) пациентов не проявляет ответ на ИИТ. Пациенты с высокими титрами ингибитора имеют меньшую вероятность ответа на лечение. Другим значительным способствующим фактором является возраст в начале ИИТ, при этом уровни успеха сильно снижены, когда пациент старше 20 (Hay et al (2005) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32:15-21)

Когда ИИТ терапия является неуспешной, ингибитор обычно продолжает существовать, и так как такие пациенты обычно имеют повышенную реакцию, то необходимо лечить эпизоды кровотечения шунтирующими FVIII продуктами, такими как концентраты активированного комплекса протомбина (FEIBATM) и рекомбинантного активированного FVII. Однако применение таких агентов ассоциировано с нежелательными явлениями, такими как диссеминированное внутрисосудистое свертывание, острый инфаркт миокарда, легочная эмболия и тромбозы (Acharya and DiMichele (2006) *Best Practice & Research Clinical Haematology* 19:51-66).

Иммуносупрессорная терапия иногда применяется для пациентов, которые не проявляют ответ на ИИТ. Лечение включает в себя введение иммуносупрессорных лекарственных средств, таких как циклофосфамид, преднизон, азатиоприн и циклоспорин, который

неспецифично метит иммунную систему. Эти обработки могут иметь побочный эффект, ассоциированный с общей иммунодепрессией.

Имеет место возобновление интереса к селективному истощению популяции В-клеток с применением Ритуксимаб™, гуманизированного моноклонального антитела к В-клеточному антигену CD20. Однако, у некоторых детей, подвергаемых лечению с этим лекарственным средством, происходят инфузионные реакции, сывороточная болезнь и оппортунистические инфекции (DiMichele (2007) J Thromb Haemost 5:143-50).

ПРИБРЕТЕННАЯ ГЕМОФИЛИЯ

Приобретенная гемофилия является редким аутоиммунным заболеванием, которым поражены от 1 до 4 людей на миллион. При этих условиях у объектов, которые не родились с гемофилией, развиваются антитела против одного из факторов свертывания, такого как фактор VIII. Считается, что беременность и аутоиммунные болезни, такие как ревматоидный артрит и рак могут увеличивать риск развития приобретенной гемофилии. Хотя нет различий в лежащих в основе иммунных механизмов, приводящих к их выработке, клинические проявления ингибиторов FVIII, выработанных ответ на коагулирующую терапию с замещением фактора и ингибиторов, выработанных в приобретенной гемофилии являются сходными.

Пациенты с приобретенной гемофилией имеют уровень смертности, который достигает 25%, отчасти из-за ассоциации приобретенных ингибиторов с сильными осложнениями с кровотечением. Терапия приобретенных ингибиторов аутоантител основана главным образом на необходимости контролировать или предотвращать острые геморрагические осложнения, который зачастую являются угрожающими жизни и конечностям, и во вторую очередь для уничтожения аутоантител для восстановления нормального коагулирования.

Некоторые кровотечения, ассоциированные с низким титром ингибиторов аутоантител (< 5 единицы Бетезда), могут быть эффективно обработаны с концентратами FVIII, вводимыми с высокими дозами. Свиной концентрат FVIII раньше считался

критической терапией первой линии для связанного с приобретенной гемофилией кровотечения, так как это являлось единственной замещающей терапией, которая предоставляла возможность действительно измерять после вливания FVIII уровни активности коагулирования в лаборатории. Продукт был выведен с рынка в 2004 из-за контаминации свиных пулов плазмы свиным парвовирусом. В настоящее время наиболее часто применяют "шунтирующие" агенты, но существуют потенциальные риски тромбогенности и имеет место только приблизительно 80% эффективность для каждого продукта. Может быть необходимо замещение плазмы посредством плазмафереза и экстракорпоральной иммуносорбции для временного снижения титра ингибитора в достаточной степени для того, чтобы шунтирующие агенты или замещение FVIII обеспечивали адекватный гемостаз.

Уничтожение ингибиторов аутоантител зависит от иммуносупрессорных мероприятий, таких как: (1) введение кортикостероидов с 30%-50% эффективностью за 3-6 недель; (2) применение цитотоксических и миелосупрессивных химиотерапевтических агентов, например, циклофосфида, циклоспорина, 2-хлордезоксиаденозина; (3) иммуномодуляция с внутривенным иммуноглобулином; и (4) селективная В-лимфоцитная деплеция с ритуксимабом. Для проявляющих ответ на Ритуксимаб™ может требоваться параллельное применение стероидов, и пациенты с рецидивом могут отвечать на лечение.

Таким образом, в настоящее время имеет место недостаток доступных способов для снижения выработки аллоантител, ассоциированных с лечением гемофилии А, и выработки аутоантител при приобретенной гемофилии. Следовательно, имеет место потребность в улучшенных способах в отношении проблемы анти-FVIII антител при гемофилии А и приобретенной гемофилии.

Авторы изобретения обнаружили, что возможно предотвращать образование ингибирующего FVIII антитела у предварительно лишённого иммуногенности пациента с FVIII-полученными пептидами и лечить заболевания, такие как гемофилия, посредством введения FVIII-полученных пептидов для того, чтобы снизить количество

ингибирующих FVIII антител.

КРАТКАЯ СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, по меньшей мере часть последовательности которого может быть получена из FVIII, который способен к индуцированию или восстановлению устойчивости к FVIII.

В первом варианте осуществления первого аспекта изобретения, изобретение относится к пептиду, содержащему полученную из FVIII последовательность DNIMVTFRNQASRPY, которая имеет одну из следующих последовательностей:

Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 17)

Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No. 18)

Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No. 19)

Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 25)

Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No. 26)

Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No. 27)

Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 29)

Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No. 30) and

Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No. 31).

Во втором варианте осуществления изобретение относится к пептиду, содержащему полученную из FVIII последовательность

PRCLTRYSSFVNME, которая имеет одну из следующих последовательностей:

Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 1)

Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No. 2)

Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No. 3)

Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 5)

Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No. 7)

Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 9)

Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No. 10)

Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No. 11) and

Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No. 13).

Во втором аспекте изобретение относится к композиции, содержащей множество пептидов, включая один или более пептидов, в соответствии с первым аспектом изобретения.

Композиция может содержать по меньшей мере один пептид в соответствии с первым вариантом осуществления и по меньшей мере один пептид в соответствии со вторым вариантом осуществления первого аспекта изобретения.

Композиция может содержать пептид, имеющий SEQ ID No. 1, и пептид, имеющий SEQ ID No. 17.

Композиция может быть в форме набора, в котором множество пептидов предоставлено для отдельного, последующего, последовательного или одновременного введения.

Пептид или композиция по изобретению могут быть использованы для подавления, снижения или предотвращения развития ингибирующих фактор VIII антител.

Настоящее изобретение также относится к применению такого пептида или композиции в получении лекарственного средства для подавления, снижения или предотвращения развития ингибирующих фактор VIII антител.

Настоящее изобретение также относится к способу подавления, предотвращения или снижения развития ингибирующих фактор VIII антител у пациента, который включает стадию введения такого пептида или композиции пациенту.

Пациент может являться дефицитным по FVIII. В частности, пациент может иметь гемофилию А, и может являться или готовиться к подверганию замещающей фактор VIII терапии.

Альтернативно пациент может быть пораженным или иметь риск возникновения приобретенной гемофилии.

Ингибиторы фактора VIII бывают обнаружены более часто у индивидуумов, экспрессирующих HLA-DR2. Пациент, получающий лечение способом по изобретению, таким образом, может являться позитивным по HLA-DR2.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1: Растворимость модифицированных пептидов FVIII

В общем тестировали 32 пептида: 16 из которых были основаны на FVIII пептиде PRCLTRYSSFVNME ("PRCLT") (SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13); и 16 из которых были основаны на FVIII пептиде DNIMVTFRNQASRPY ("DNIMV") (SEQ ID No. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Их растворимость тестировали относительно несвязанного контрольного пептида (4Y), который, как известно, является достаточно растворимым для применения в качестве вызывающего толерантность антигена. На диаграмме, зеленый представляет пептид, который является по меньшей мере настолько же растворимым, как 4Y, оранжевый представляет пептид который

является не точно настолько же растворимым как 4Y, но очень близок к этому, и красный представляет пептид, который является не настолько же растворимым как 4Y. Пептиды, обозначенные зеленым, являлись настолько же растворимыми, как контрольный пептид 4Y, пептиды, обозначенные красным, являлись плохо растворимыми, и один пептид, обозначенный янтарным, имел промежуточную растворимость.

Фиг.2: Растворимость меченых пептидов в водном растворе.

Концентрацию пептида в растворе после растворения в ДМСО (контроль) или PBS определяли спектрофотометрически и сравнивали с ожидаемой величиной 4 мг/мл. Большое различие между реальной и ожидаемой концентрацией соответствует более низкой относительной растворимости.

Фиг.3: Меченые пептиды действуют в качестве апитопов

Проводили антиген-представляющие анализы со свежими и фиксированными антиген-представляющими клетками для исследования того, если меченые пептиды, подобно исходным пептидам PRCLT и DNIMV, способны к связыванию с молекулой MHC и к представлению Т-клетке без обработки антигена, (a) PRCLT пептиды; (b) DNIMV пептиды.

Фиг.4: Пептиды, имеющие SEQ ID 1 и SEQ ID 2, регулируют Т-клеточный ответ на PRCLT

Фигура демонстрирует вторичные ответы HLA-DR2 трансгенных мышей обработанных или с SEQ ID 1, SEQ ID 2, или с контролем (PBS) и примированных с PRCLT. Индексы Т-клеточной стимуляции продемонстрированы в широком диапазоне пептидных концентраций против FVIII и контрольной PPD.

Фиг.5: Пептиды, имеющие SEQ ID 17 и SEQ ID 18, регулируют Т-клеточный ответ на DNIMV.

Фигура демонстрирует вторичные ответы HLA-DR2 трансгенных мышей, обработанных или с SEQ ID 17, SEQ ID 18, или с контролем (PBS) и примированных с DNIMV. Индексы Т-клеточной стимуляции продемонстрированы в широком диапазоне пептидных концентраций и против FVIII и контрольной PPD.

Фиг.6: Пептиды, имеющие SEQ ID 1 и SEQ ID 17, регулируют Т-клеточный ответ на их исходные пептиды.

Фигура демонстрирует вторичные ответы HLA-DR2 трансгенных мышей, обработанных с или SEQ ID1, или SEQ ID 17, или контролем (PBS) и примированных с PRCLT и DNIMV и повторно иммунизированных *in vitro* с PRCLT, DNIMV или FVIII. Индексы Т-клеточной стимуляции продемонстрированы в широком диапазоне пептидных концентраций и против FVIII. Имеет место значительное ингибирование Т-клеточных ответов на исходные пептиды.

Фиг.7: Комбинация пептида, имеющего SEQ ID No. 1, и пептида, имеющего SEQ ID No. 17, ингибирует выработку анти-FVIII антител *in vivo*.

Фигура демонстрирует конечную точку титров анти-FVIII антитела мышей, обработанных с комбинацией SEQ ID 1 и SEQ ID 17 (или PBS контроль) и иммунизированных с 8 еженедельными иммунизациями FVIII.

Фиг.7а: результаты на день 28

Фиг.7b: результаты на день 56

Фиг.8: Комбинация пептида, имеющего SEQ ID No. 1, и пептида, имеющего SEQ ID No. 17, предотвращает нейтрализующую выработку анти-FVIII антител *in vivo* при подвергании воздействию FVIII

Фигура демонстрирует уровни нейтрализующих анти-FVIII антител у мышей, обработанных с комбинацией SEQ ID 1 и SEQ ID 17 (или PBS контроль), перед и во время 8 еженедельных иммунизаций FVIII. На день 56 имеет место значительное снижение нейтрализующих антител у обработанных пептидом мышей.

Фиг.9: Комбинация пептида, имеющая SEQ ID No. 1, и пептида, имеющего SEQ ID No. 17, ингибирует Т-клеточные ответы на FVIII.

Фигура демонстрирует вторичные ответы HLA-DR2 трансгенных мышей, обработанных с комбинацией SEQ ID 1 и SEQ ID 17 или контролем (PBS) и примированных с DNIMV и PRCLT. Индексы Т-клеточной стимуляции продемонстрированы в широком диапазоне концентраций FVIII.

Фиг.10: Комбинация пептида, имеющего SEQ ID No.1, и пептида, имеющего SEQ ID No. 17, супрессирует выработку нейтрализующего анти-FVIII антитела в терапевтической

животной модели с непрерывным иммунным ответом на FVIII

Фигура демонстрирует уровни нейтрализующих анти-FVIII антител у мышей, обработанных с комбинацией SEQ ID 1 и SEQ ID 17, или контрольным пептидом 133-152 простатической кислой фосфатазы (PAP) (последовательность, как описано в PCT/US2006/031961, SEQ ID No. 15) после индуцирования иммунного ответа на FVIII и выработки анти-FVIII антитела. Мыши получали пептидное лечение через три недели после иммунизирования rFVIII и перед бустер-иммунизацией с rFVIII. Через две недели после бустер-иммунизирования FVIII (неделя 7) имело место значительное снижение нейтрализующих анти-FVIII антител у обработанных пептидом мышей, которое поддерживалось в ходе эксперимента вплоть до недели 13.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

ПЕПТИД

Данное изобретение относится к пептиду.

Термин "пептид" применен в обычном значении в качестве обозначения ряда остатков, как правило L-аминокислот, соединенных друг с другом, как правило пептидными связями между α -амино и карбоксильными группами смежных аминокислот. Термин включает в себя модифицированные пептиды и синтетические пептидные аналоги.

Пептид по данному изобретению может быть получен с применением химических способов (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.). Например, пептиды могут быть синтезированы твердофазными технологиями (Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204), отщеплены со смолы и очищены препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (например, Creighton (1983) Proteins Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). Автоматизированный синтез может быть выполнен, например, с применением ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем.

Пептид может альтернативно быть получен с помощью рекомбинантных средств, или отщеплением пептида от фактора VIII

с последующей модификацией одного или более концов. Композиция пептида может быть подтверждена аминокислотному анализу или секвенированию (например, процедура деградации по Эдману).

Для практических целей существуют различные другие характеристики, которые может демонстрировать пептид. Например, важно, чтобы пептид был достаточно стабильным *in vivo* для того, чтобы он был терапевтически пригодным. Время полужизни пептида *in vivo* может составлять по меньшей мере 10 минут, 30 минут, 4 часа или 24 часа.

Пептид может также демонстрировать хорошую биодоступность *in vivo*. Пептид может поддерживать конформацию *in vivo*, которая позволяет ему связываться с молекулой МНС на клеточной поверхности без стерических затруднений.

АПИТОПЫ

В адаптативном иммунном ответе Т-лимфоциты способны к распознаванию внутренних эпитопов белкового антигена. Антиген-представляющие клетки (АПК) связывают белковые антигены и разрушают их на короткие пептидные фрагменты. Пептид может связывать молекулу главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I или II внутри клетки и быть транспортирован к клеточной поверхности. В представленном на клеточной поверхности виде в соединении с молекулой МНС пептид может быть распознан Т-клеткой (через Т-клеточный рецептор (ТКР)), в этом случае пептид является Т-клеточным эпитопом.

Эпитоп таким образом является пептидным производным антигена, которое имеет возможность быть связанным с пептид-связывающей бороздкой молекулы МНС класса I или II и быть распознанным Т-клеткой.

Минимальный эпитоп является самым коротким фрагментом, получаемым из эпитопа, который имеет возможность быть связанным с пептид-связывающей бороздкой молекулы МНС класса I или II и быть распознанным Т-клеткой. Для определенной иммуногенной области как правило возможно выработка "вложенного набора" перекрывающихся пептидов, который действует в качестве эпитопов, все из которых содержат минимальный эпитоп, но различаются по их фланкирующим областям.

Таким же образом возможно идентифицировать минимальный эпитоп для конкретной комбинации молекула МНС:Т-клетка посредством измерения ответа на укороченные пептиды. Например, если ответ получен на пептид, содержащий остатки 1-15 в перекрывающейся библиотеке, наборы, которые являются укороченными на обоих концах (т.е. 1-14, 1-13, 1-12 и т.д. и 2-15, 3-15, 4-15 и т.д.), могут быть применены для идентифицирования минимального эпитопа.

Авторы данного открытия предварительно определили, что существует связь между способностью пептида связываться с молекулой МНС класса I или II и быть представленным для Т-клетки без дальнейшего процессинга антигена, и способностью пептида индуцировать устойчивость *in vivo* (WO 02/16410). Если пептид является слишком длинным для связывания пептид-связывающей бороздки молекулы МНС без дальнейшего процессинга (например, отсечения) или связывается в неподходящей конформации, то он затем не будет толерогенным *in vivo*. Если с другой стороны пептид имеет подходящий размер и конформацию для того, чтобы быть связанным непосредственно с пептид-связывающей бороздкой МНС и быть представленным Т-клетке, то можно предсказать, что этот пептид будет пригоден для индукции устойчивости.

Таким образом возможно исследовать толерогенную способность пептида исследованием того, может ли он связывать молекулу МНС класса I или II и быть представлен Т-клетке без дальнейшего процессинга антигена *in vitro*.

Пептиды по данному изобретению являются апитопами (независимые от Антигенного Процессинга эпитОПЫ) в том смысле, что они способны к связыванию с молекулой МНС класса II и стимулированию ответа от специфичных к фактору VIII Т-клеток без дальнейшего антигенного процессинга. Можно предсказать, что такие апитопы вызовут устойчивость к FVIII, в соответствии со способом, основанным на правилах, описанных в WO 02/16410.

Пептид по данному изобретению может иметь любую длину, которая предоставляет возможность связывания с молекулой МНС класса I или II без дальнейшего процессинга. Как правило,

пептид по данному изобретению способен к связыванию МНС класса II.

Пептиды, которые связываются с молекулами МНС класса I, как правило, имеют от 7 до 13, более часто от 8 до 10 аминокислот в длину. Связывание пептида стабилизировано на его двух концах контактами между атомами в главной цепи пептида и инвариантными сайтами в пептид-связывающей бороздке всех молекул МНС класса I. Существуют инвариантные сайты на обоих концах бороздки, которые связывают амино- и карбокси-концы пептида. Вариации в пептидной длине регулируются изгибанием пептидного остова, часто в месте остатков пролина или глицина, что позволяет требуемую гибкость.

Пептиды, которые связывают молекулы МНС класса II, как правило, имеют между 8 и 20 аминокислот в длину, более часто между 10 и 17 аминокислот в длину, и могут быть длиннее (например, вплоть до 40 аминокислот). Эти пептиды располагаются в протянутой конформации вдоль пептид-связывающей бороздки, которая в МНС II (в отличие от пептид-связывающей бороздки МНС класса I) является открытой с обоих концов. Пептид удерживается на месте в основном контактами атомов главной цепи с консервативными остатками, которые ограничивают пептид-связывающую бороздку.

ПЕПТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Первый вариант осуществления изобретения относится к пептиду, содержащему полученную из FVIII последовательность. Полученные из FVIII последовательности, которые исследовали в примерах, имеют следующие последовательности

SEQ ID No. 1: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 2: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 3: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 4: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 5: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 6: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 7: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 8: Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 9: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 10: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 11: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 12: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 13: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 14: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 15: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 16: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 17: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 18: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 19: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 20: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 21: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 22: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 23: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 24: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 25: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 26: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 27: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

SEQ ID No. 28: Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

SEQ ID No. 29: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

SEQ ID No. 30: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

SEQ ID No. 31: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys.

SEQ ID No. 32: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu.

Термин "имеет" или "имеющий" подразумевается как обозначающий, что пептид состоит из данной аминокислотной последовательности.

Данное изобретение предоставляет пептид, который содержит последовательность DNIMVTFRNQASRPY и имеет одну из следующих последовательностей: SEQ ID No. 17, 18, 19, 25, 26, 27, 29, 30 или 31.

Пептид может иметь одну из следующих последовательностей: SEQ ID No. 17, 18, 25 или 26.

Пептид может иметь SEQ ID No. 17 или 18.

Пептид может иметь SEQ ID No. 17.

Данное изобретение также предоставляет пептид, который содержит последовательность PRCLTRYSSSFVNME и имеет одну из следующих последовательностей: SEQ ID No. 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11 или 13.

Пептид может иметь одну из следующих последовательностей: SEQ ID No. 1, 2, 9 или 10.

Пептид может иметь SEQ ID No. 1 или 2.

Пептид может иметь SEQ ID No. 1.

ФАКТОР VIII

Последовательности DNIMVTFRNQASRPY и PRCLTRYSSSFVNME, которые образуют центральный участок пептидов по изобретению, являются получаемыми из фактора VIII.

Фактор VIII принимает участие во внутреннем пути коагулирования крови; фактор VIII является кофактором для фактора IXa, который в присутствии Ca^{+2} и фосфолипидов, превращает фактор X в активированную форму Xa.

Ген фактора VIII продуцирует два альтернативно

сплайсированных транскрипта. Вариант транскрипта 1 кодирует большой гликопротеин, изоформы а, который циркулирует в плазме и ассоциируется с фактором фон Виллебранда в нековалентный комплекс. Этот белок подвергается множеству этапов расщепления. Вариант транскрипта 2 кодирует гипотетический малый белок, изоформы b, который главным образом состоит из фосфолипид-связывающего домена фактора VIIIC. Этот связывающий домен необходим для коагулирующей активности.

Полная последовательность гена из 186000 пар оснований человеческого фактора VIII была раскрыта в середине 1980-х (Gitschier et al (1984) Nature 312 326-330). В то же время клоны ДНК, кодирующие полную последовательность из 2351 аминокислот, применяли для продуцирования биологически активного фактора VIII в культивируемых клетках млекопитающих (Wood et al (1984) Nature 312:330-337). Полная последовательность из 2351 аминокислот для человеческого фактора VIII приведена в SEQ ID No. 33.

РАСТВОРИМОСТЬ

Пептид по первому варианту осуществления изобретения является модифицированной формой одного из следующих пептидов:

DNIMVTFRNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME

Уже было продемонстрировано, что эти пептиды действуют в качестве апитопов и являются толерогенными *in vivo* (См. примеры и международную заявку на патент No PCT/GB2008/003996).

После этого было обнаружено, что растворимость является важным фактором в пептид-опосредованной индукции устойчивости.

Авторы данного открытия обнаружили, что растворимость может быть улучшена встраиванием глицинового спейсера в оба конца, с последующими комбинациями двух дополнительных аминокислот, которые могут представлять собой лизин (K) и/или глутаминовую кислоту (E) на оба из N и C-концов. Следовательно, возможная комбинация на определенном конце представляет собой KK, KE, EK или EE.

Следовательно, модифицированные пептиды по данному

изобретению имеют 6 дополнительных аминокислот (3 на каждом конце) по сравнению с исходными пептидами DNIVM и PRCLT.

Пептиды по данному изобретению имеют общую формулу:

XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX или

XXGPRCLTRYYSFVNMEGXX

где X представляет собой или лизин, или глутаминовую кислоту.

Модифицированный пептид может являться более растворимым, чем исходный (немодифицированный) пептид. Модифицированный пептид может иметь в 2, 3, 4 или в 5 раз большую растворимость, чем исходный пептид. Пептид может быть растворимым в концентрации вплоть до 0,5 мг/мл, 1 мг/мл или 5 мг/мл.

УСТОЙЧИВОСТЬ

T-клеточные эпитопы играют центральную роль в адаптивном иммунном ответе на любой антиген, или собственный, или чужеродный. Центральная роль, играемая T-клеточными эпитопами в болезнях гиперчувствительности (которые включают аллергию, аутоиммунные болезни и отторжение трансплантата), была продемонстрирована посредством применения экспериментальных моделей. Возможно индуцировать воспалительные или аллергические болезни посредством инъекции синтетических пептидов (на основании структуры T-клеточных эпитопов) в комбинации с адъювантом.

В отличие от этого, было продемонстрировано, что возможно индуцировать иммунологическую устойчивость по отношению к конкретным антигенам введением пептидных эпитопов в растворимой форме. Было продемонстрировано введение растворимых пептидных антигенов в качестве эффективного средства для ингибирования болезни в экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (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); и экспериментальных моделях артрита, диабета и увеоретинита (рассматриваемых в Anderton and Wraith (1998), как приведено выше). Это также было продемонстрировано в качестве средства лечения продолжающейся болезни в EAE (Anderton and

Wraith (1998), как приведено выше).

Устойчивость представляет собой отсутствие ответа на антиген. Устойчивость на собственные антигены является необходимым свойством иммунной системы, когда она утеряна, результатом может быть аутоиммунная болезнь. Адаптивная иммунная система должна поддерживать способность отвечать на огромное разнообразие инфекционных агентов, при этом избегая аутоиммунной атаки на собственные антигены, содержащиеся внутри его собственных тканей. Это контролируется в большой степени чувствительностью незрелых Т-лимфоцитов к апоптической клеточной смерти в тимусе (центральная устойчивость). Однако не все собственные антигены детектируемы в тимусе, так что смерть аутореактивных тимоцитов остается незавершенной. Таким образом существуют также механизмы, посредством которых устойчивость может быть приобретена посредством зрелых аутореактивных Т-лимфоцитов в периферических тканях (периферическая устойчивость). Обзор механизмов центральной и периферической устойчивости приведен в Anderton et al (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

При гемофилии А пациенты имеют дефект в гене фактора VIII. Это означает, что фактор VIII не распознается как "ауто" антиген иммунной системой. Когда фактор VIII вводят во время коагулирующей терапии с замещением фактора, то, следовательно, аллоиммунный ответ вырабатывается на чужеродный белок, приводя к выработке ингибирующих FVIII антител.

Пептиды по данному изобретению способны к индуцированию устойчивости к фактору VIII, так что когда FVIII вводят профилактически, он не индуцирует иммунный ответ, и FVIII ингибиторы не развиваются; и когда его вводят терапевтически, это приводит к тому, что выработка FVIII ингибитора является сниженной или ингибированной.

Приобретенная гемофилия является аутоиммунной болезнью, при которой устойчивость к фактору VIII разрушается. В этом случае, пептиды по данному изобретению могут быть введены для восстановления устойчивости к этому собственному белку и сокращения патогенного иммунного ответа.

Устойчивость может являться результатом или характеризоваться индукцией анэргии в по меньшей мере одном участке Т клеток CD4+. Для того, чтобы активировать Т-клетку, пептид должен ассоциироваться с "профессиональной" АПК, способной к доставке двух сигналов к Т-клеткам. Первый сигнал (сигнал 1) доставляется посредством комплекса МНС-пептид на клеточной поверхности АПК и воспринимается Т-клеткой посредством ТКР. Второй сигнал (сигнал 2) доставляется посредством ко-стимулирующей молекулы на поверхность АПК, такой как CD80 и CD86, и воспринимается посредством CD28 на поверхности Т-клетки. Считается, что, когда Т-клетка получает сигнал 1 в отсутствии сигнала 2, она не становится активированной и, на самом деле, становится анергической. Анергические Т-клетки являются невосприимчивыми к последующему антигенному стимулу, и могут быть способны к подавлению других иммунных ответов. Считается, что анергические Т-клетки задействованы в опосредовании Т-клеточной устойчивости.

Не желая быть связанным теорией, авторы данного открытия предполагают, что пептиды, для которых требуется процессинг перед тем, как они могут быть представлены в комплексе с молекулами МНС, не индуцируют устойчивость, так как они должны быть обработаны зрелыми антиген-представляющими клетками. Зрелые антиген-представляющие клетки (такие как макрофаги, В-клетки и дендритные клетки) способны к антигенному процессингу, а также к доставке обоих сигналов 1 и 2 к Т-клетке, приводя к Т-клеточной активации. Апитопы, с другой стороны, будут способны связывать МНС класса II на незрелых АПК. Таким образом они будут представлены Т-клеткам без костимуляции, приводя к Т-клеточной анэргии и устойчивости.

Без сомнения, апитопы могут быть также способны к связыванию с молекулами МНС на клеточной поверхности зрелых АПК. Однако, иммунная система содержит большее количество незрелых, чем зрелых АПК (было предположено, что менее чем 10% дендритных клеток являются активированными, Summers et al. (2001) Am. J. Pathol. 159: 285-295). Положением по умолчанию по отношению к апитопу следовательно будет анэргия/устойчивость, в

большей степени, чем активация.

Индукцию устойчивости к FVIII можно контролировать *in vivo* наблюдением за снижением уровня:

- (i) ингибиторных антител FVIII:
- (ii) Т-клеток CD4+, специфичных к FVIII
- (iii) В-клеток, способных к секретированию ингибирующих FVIII антител, посредством технологий, известных в данной области.

Индукцию устойчивости, следовательно, также можно контролировать различными технологиями, включая:

- (a) индукцию анэргии в Т-клетках CD4+ (которые могут быть детектированы последующим стимулом с FVIII *in vitro*);

- (b) изменения в Т-клеточной популяции CD4+, включая

- (i) снижение пролиферации;

- (ii) понижающую регуляцию в выработке IL-2, IFN- γ и IL-4;

и

- (iii) повышение выработки IL-10.

В применяемом в данном документе значении термин "толерогенный" означает способный к индуцированию устойчивости.

КОМПОЗИЦИЯ

Данное изобретение также относится к композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащая один или более пептидов в соответствии с изобретением.

Композиция может содержать модифицированную форму пептида DNIMVTFRNQASRPY и модифицированную форму пептида PRCLTRYSSSVNME.

Пептид может содержать множество пептидов, например, два, три, четыре, пять или шесть пептидов.

Композиция по данному изобретению может быть предназначена для профилактического или терапевтического применения.

При введении для профилактического применения, композиция может снижать или предотвращать выработку иммунного ответа на FVIII. Уровень иммунного ответа является меньшим, чем был бы достигнут у пациента, которого не обрабатывали с композицией. Термин "снижает" указывает, что наблюдали частичное снижение иммунного ответа, такое как снижение на 50%, 70%, 80% или 90%

ответа, который наблюдали бы у пациента, которого не обрабатывали с композицией (или ответа, наблюдаемого у необработанного пациента в течение того же временного интервала). Термин "предотвращает" указывает на то, что не наблюдали существенный иммунный ответ на FVIII.

При введении для терапевтического применения композиция может подавлять уже существующий иммунный ответ на FVIII. Термин "подавлять" указывает на снижение уровня постоянного иммунного ответа по сравнению с уровнем перед пептидным лечением, или уровнем, который наблюдали бы в той же временной точке без предоставления лечения.

Лечение с композицией по данному изобретению может вызывать снижение уровней любого или всего из следующего:

- (i) Ингибирующие FVIII антитела
- (ii) Т-клетки CD4+, специфичные к FVIII
- (iii) В-клетки, секретирующие ингибирующие FVIII антитела.

Детектирование всех этих факторов, может быть осуществлено посредством технологий, известных в данной области, таких как ELISA, проточная цитометрия, хромогенный анализ коагулирующей активности и т.д.

Лечение с композицией по данному изобретению может также или альтернативно вызывать анэргию в Т-клетках CD4+, специфичных к FVIII. Анэргия может быть детектирована посредством, например, последующего стимула с FVIII *in vitro*.

Важно иметь ввиду, что не все иммунные ответы к FVIII являются патогенными. Неингибиторные анти-FVIII антитела могут быть обнаружены у пациентов с гемофилией без ингибиторов (Moreau et al (2000) Blood 95:3435-41) и примерно у 15% доноров здоровой крови (Algiman et al (1992) 89:3795-9).

FVIII ингибиторы могут быть детектированы посредством модификации Ниймегена анализа коагулирования Бетезда, в котором тестируют способность плазмы пациента инактивировать FVIII в нормальной плазме. Единица Бетезда (Bethesda unit, BU) определяется как количество антитела, которое нейтрализует 50% активности FVIII в плазме, и титры 0,6 BU или больше предполагают присутствие антитела.

Ингибиторы обычно классифицируются как имеющие низкий титр, если уровень составляет <5 BU и высокий титр, если ≥ 5 BU.

Уровень циркулирующих ингибирующих FVIII антител может быть снижен до 90%, 75%, 50%, 20%, 10% 5% от уровня антител, который бы наблюдали, если бы пациент не получал лечение.

Уровень циркулирующих ингибирующих FVIII антител может быть снижен до 5, 4, 3, 2, 1 или 0,5 BU.

Пептиды и композиция по изобретению могут увеличивать количество или долю терапевтически вводимого FVIII, которая доступна для содействия свертыванию у пациента. Это обусловлено снижением ингибиторов FVIII, которые могут эффективно устранять часть FVIII без проявления его терапевтической функции. Пептид или композиция по изобретению могут увеличивать количество доступного FVIII на, например, 10%, 25%, 50% 75% или 100%.

Пептиды и композиция по изобретению могут таким образом снижать количество FVIII, которое необходимо вводить для содействия свертыванию у пациента.

СОСТАВЛЕНИЕ

Композиция может быть приготовлена в виде инъектируемого или в виде жидкого раствора или суспензии; также может быть приготовлена твердая форма, пригодная для растворения в или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Препарат может также быть эмульгирован, или пептиды инкапсулированы в липосомы. Активные ингредиенты могут быть смешаны со вспомогательными веществами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. Пригодными вспомогательными веществами являются, например, вода, солевой раствор (например, забуференный фосфатом солевой раствор), декстроза, глицерин, этанол или тому подобное и их комбинации.

В дополнение, если требуется, композиция может содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты и/или буферизующие pH агенты. Буферизующие соли включают в себя фосфат, цитрат, ацетат, для доведения pH могут быть применены соляная кислота и/или гидроксид натрия. Для стабилизации могут быть применены

дисахариды, такие как сахароза или трегалоза.

Если композиция содержит множество пептидов, то относительное соотношение пептидов может быть примерно равным. Альтернативно относительные соотношения каждого пептида могут быть изменены, например, для сосредоточивания толерогенного ответа на конкретной разновидности аутореактивных Т-клеток, или если было обнаружено, что один пептид работает лучше, чем другие в частности HLA типы.

После составления композиция может быть заключена в стерильный контейнер, который затем герметически закрывается и хранится при низкой температуре, например 4°C, или она может быть высушена замораживанием.

В целях удобства композиция приготовлена в виде лиофилизированного (высушенного замораживанием) порошка. Лиофилизация позволяет длительное хранение в стабилизированной форме. Процедуры лиофилизации хорошо известны в данной области, см. например, <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>.

Увеличивающие объем агенты обычно применяют перед замораживанием-высушиванием, такие как маннит, декстран или глицин.

Композиция может быть введена подходящим образом, таким как посредством орального, внутривенного (при растворимости в воде), внутримышечного, подкожного, подъязычного, внутриносового, внутрикожного или суппозиторного путей или имплантирования (например, с применением молекул с замедленным высвобождением).

Композиция может быть предпочтительно введена через внутриносовой, подкожный или внутрикожный пути.

Пептид и композиция по изобретению могут быть применены для лечения объекта, являющегося человеком. Объект может иметь гемофилию А, в частности сильную гемофилию А. Объект может являться генетически дефицитным по FVIII. Объект может иметь приобретенную гемофилию. Объект может иметь ингибиторные анти-FVIII антитела.

Объект может подвергаться или готовиться к подверганию коагулирующей замещающей терапии с FVIII.

Объект может подвергаться или готовиться к подверганию терапии с шунтирующими агентами [с или без коагулирующей замещающей терапии с FVIII].

Объект может подвергаться или готовиться к подверганию генетической терапии с геном FVIII.

Объект может иметь HLA-гаплотип, который ассоциирован с предрасположенностью к развитию ингибиторных анти-FVIII аллоантител или аутоантител. Объект может экспрессировать HLA-DR2. Способы для определения гаплотипа HLA у индивидуума известны в данной области.

Как правило, врач определит реальную дозировку, которая будет наиболее пригодной для индивидуального объекта, и она будет варьироваться с возрастом, весом и ответом конкретного пациента.

В предпочтительно варианте осуществления может быть осуществлен протокол "эскалация дозы", где множество доз вводят пациенту в возрастающих концентрациях. Такой подход применяли, например, для пептидов фосфолипазы A2 в иммунотерапевтических приложениях против аллергии на пчелиный яд (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 and Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

НАБОРЫ

В целях удобства, если композиция содержит множество пептидов, они могут быть введены вместе в форме смешанной композиции или коктейля. Однако могут иметь место обстоятельства, при которых предпочтительно предоставлять пептиды отдельно в форме набора для одновременного, отдельного, последовательного или комбинированного введения.

Набор может также содержать средство для смешивания и/или введения (например, испаритель для внутриносового введения или шприц и иглу для подкожного/внутрикожного дозирования). Набор может также содержать инструкции для применения.

Фармацевтическая композиция или набор по изобретению могут быть применены для лечения и/или предотвращения болезни.

В частности композиция/набор могут быть применены для лечения и/или предотвращения образования анти-FVIII ингибитора у пациентов с гемофилией А или приобретенной гемофилией. Композиция/набор могут быть применены для лечения гемофилии с нарушением, заключающемся в наличии нейтрализующих FVIII антител.

ГЕМОФИЛИЯ А

Гемофилия А (классическая гемофилия) вызвана недостатком фактора VIII.

Гемофилия А имеет предположительную частоту возникновения 1 на 10000 мужчин, тогда как гемофилия В предположительно встречается у одного из 40000 мужчин. Примерно 1 женщина на 5000 является носителем гемофилии А, и 1 на 20000 является носителем гемофилии В.

Гемофилию, как правило, подразделяют на три класса: сильную, умеренную и слабую, на основании уровня фактора свертывания в крови. При сильной гемофилии, имеет место менее чем 1 процент от нормального фактора свертывания. Степень тяжести имеет тенденцию быть единообразной от поколения к поколению.

Несмотря на распространенное мнение, небольшие порезы и раны обычно не представляют угрозу для страдающих гемофилией. Наибольшая опасность в большей степени исходит от самопроизвольного кровотечения, которое может случиться в суставах и мышцах. Это наиболее вероятно может произойти в годы быстрого роста, как правило, в возрасте между 5 и 15 годами.

Повторяющееся самопроизвольное кровотечение в суставы может вызывать артрит и слабость смежных мышц. Давление на нервы вызванное посредством накопления крови может привести в результате к боли, онемению и временной неспособности двигать поврежденной областью.

Гемофилию А обычно диагностируют с анализом крови для определения эффективности свертывания и исследования того, являются ли уровни факторов свертывания аномальными.

Развитие очищенных факторов свертывания, выделенных из донорской крови, в 1970-е значительно улучшило долгосрочный

прогноз для страдающих гемофилией. Страдающие от слабой до умеренной гемофилии могут применять лечение с FVIII применительно к каждой отдельной ситуации, тогда как для страдающих от сильной гемофилии может требоваться регулярное, неограниченное лечение.

Ранее пациентам вводили концентраты фактора VIII, объединенные из тысяч порций донорской плазмы. Это приводило к значительным проблемам, связанным с контаминацией с вирусными патогенами, в частности вирусом человеческого иммунодефицита и вирусами гепатита. Технология очистки моноклонального антитела, инаktivация нагреванием и обработка виروцидным детергентом переводят полученные из плазмы концентраты в относительно безопасное состояние.

Технология рекомбинантных ДНК в настоящее время предоставляет ряд синтетических продуктов, таких как Recombinate™ и Kogenate™. Kogenate изготовлен с применением клеток почек новорожденного хомяка, экспрессирующих человеческий фактор VIII. Полученный в результате фактор является высокоочищенным, исключая любую возможность переноса вируса из плазмы.

Пептид или композиция по данному изобретению могут быть введены перед и/или во время замещающей терапии с фактором VIII.

Гемофилия А является идеальной целевой болезнью для генной терапии потому что: i) она вызвана посредством мутации в индивидуальном идентифицированном гене, ii) небольшое повышение уровней фактора свертывания *in vivo* может превратить сильную гемофилию в более слабую болезнь, и iii) существующие заместительные терапии считаются субоптимальными. Также существует широкий диапазон безопасности, если имеет место "чрезмерное превышение" требуемого уровня коагулирующей активности.

К сожалению, к настоящему времени перспектива генной терапии в качестве средства излечения для гемофилии не была реализована, главным образом из-за трудностей в обнаружении

системы генетической доставки, которая являлась бы достаточно неиммуногенной для предоставления возможности долговременной экспрессии фактора свертывания.

Пептиды по данному изобретению также пригодны для вызывания толерантности у объекта перед генной терапией с фактором VIII и/или контролирования образования ингибитора FVIII у пациента после генной терапии.

ПРИБРЕТЕННАЯ ГЕМОФИЛИЯ

Приобретенная гемофилия характеризуется наличием ингибиторных аутоантител против FVIII у индивидуумов с ранее нормальным коагулированием. Это является редким состоянием с предположительной частотой возникновения 1-3 на миллион людей в год. Уровень смертности, ассоциированный с приобретенным ингибиторами аутоантител, достигает 25% в сравнении со значительно более низким риском смерти при наличии аллоантител.

По сравнению с пациентами с ингибиторами аллоантител приобретенная гемофилия характеризуется: (1) более сильным характером кровотечения; (2) более высокой частотой возникновения в более старшей популяции; (3) встречаемостью в сочетании с идентифицируемыми лежащими в основе аутоиммунными болезнями, лимфопролиферативными или злокачественными твердыми опухолями, беременностью и применением определенных антибиотиков, таких как пенициллин и сульфонамиды в примерно 50% случаев; и (4) *in vitro* ингибиторной активностью, которая сопровождает тип II фармакокинетической модели с неполной нейтрализацией активности меченого фактора свертывания аутоантителом, как правило, приводя в результате к остаточным уровням фактора VIII, варьирующимся между 2%-18% в плазме пациента.

Пептид или композиция по данному изобретению могут быть введены пациенту с приобретенной гемофилией или пациенту, который, как предполагается, имеет риск развития приобретенной гемофилии из-за, например:

i) предстоящего лечения, например, с пенициллином или сульфонамидом

ii) прогрессирования опухоли или другого злокачественного

образования

iii) предстоящей или ранней беременности.

Изобретение далее будет описано посредством примеров, которые предусмотрены в качестве помощи для специалиста в данной области в воплощении изобретения на практике, и не подразумевается, что они каким-либо образом ограничивают объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Исследование растворимости полученных из FVIII пептидов.

В общем 32 пептида тестировали: 16 которых были основаны на FVIII пептиде PRCLTRYSSSFVNME ("PRCLT"); и 16 которых были основаны на FVIII пептиде DNIMVTFRNQASRPY ("DNIMV"). Все пептиды приведены в таблицах 1 и 2 далее.

Таблица 1
Полученные из PRCLT пептиды

Пептид	Последовательность	SEQ ID No.
1	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	1
2	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	2
3	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	3
4	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	4
5	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	5
6	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	6
7	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	7
8	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	8
9	Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	9
10	Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	10

11	Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	11
12	Lys- Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	12
13	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	13
14	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	14
15	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	15
16	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	16

Таблица 2

Полученные из DNIMV пептиды

Пептид	Последовательность	SEQ ID No.
17	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	17
18	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	18
19	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	19
20	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	20
21	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	21
22	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	22
23	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	23
24	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	24
25	Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	25
26	Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	26

27	Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	27
28	Lys- Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	28
29	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	29
30	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	30
31	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	31
32	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	32

Стоковый раствор 20 мг/мл каждого тестового пептида готовили в ДМСО. Стоковый раствор контрольного пептида, полученного из MBP пептида, известного как 4Y, также готовили в ДМСО. Пептид 4Y имеет последовательность Ac-ASQYRPSQR. Он является структурно непохожим на тестовые пептиды, но, известно, что он является достаточно растворимым для применения в качестве вызывающего толерантность антигена.

Последовательные разведения пептидного раствора объемом 40 мкл осуществляли посредством добавления воды в 96-луночный планшет с получением концентраций 10, 5, 2,5 и 1,25 мг/мл

Планшеты оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа для предоставления возможности образования осадка и затем центрифугировали при 14800 об/мин в течение 10 минут для отделения осажденного/коллоидного пептида от истинно растворенного вещества.

2 мкл образца с самой верхней части каждой пробирки отбирали для анализа. Поглощательную способность измеряли при длине волны 280 нм и рассчитывали концентрацию (мг/мл).

Результаты продемонстрированы на фиг.1. Некоторые меченые пептиды продемонстрировали растворимость, эквивалентную 4Y, даже при высокой концентрации. Пептиды, кодирующие зеленый, были настолько же растворимы, как контрольный пептид 4Y, пептиды, кодирующие красный, были плохо растворимы, и один

пептид, кодирующий янтарный, имел промежуточную растворимость.

Пример 2 – Прямое растворение меченых пептидов в водном растворителе в клинически значимой концентрации

Для каждого тестового пептида и исходных пептидов (PRCLT и DNIMV) подготавливали две пробирки с 4 мг/мл или в ДМСО (контроль), или в PBS.

Каждую пробирку центрифугировали при максимальной полной скорости в миницентрифуге в течение 5 минут. 10 мкл образца отбирали из верхней части каждого раствора и регистрировали молекулярный вес и коэффициент поглощения для каждого пептида.

Поглощательную способность супернатанта измеряли с применением NanoDrop и рассчитывали концентрацию. Реальную концентрацию сравнивали с ожидаемой величиной 4 мг/мл, результаты продемонстрированы на фиг.2. На этой фигуре, большее различие между реальной и ожидаемой концентрацией соответствует более низкой относительной растворимости.

Как показано на фиг.2, все меченые пептиды SEQ ID No. 1, 2, 9, 10, 17, 18, 25 и 26 имели улучшенную растворимость в PBS по сравнению с исходными пептидами.

Пример 3 – Меченые пептиды действуют в качестве апитопов

Трансгенных мышей HLA-DR2 примировали с исходными пептидами PRCLT или DNIMV. Затем вырезали селезенку и лимфоузлы, и после очистки CD4, клетки повторно стимулировали с 1 мкг/мл человеческого рекомбинантного FVIII. После слияния с клетками BW5147, полученные в результате клоны размножали и 'скринировали' на специфичность к DNIMV или PRCLT. Это выполняли посредством инкубирования гибридомных клеток с 5×10^4 DR2-позитивных антиген-представляющих клеток (клеточная линия MGAR) и 10 мкг/мл PRCLT/DNIMV или среды в течение 48 часов. Затем супернатанты анализировали на выработку IL-2 посредством ELISA.

Клоны, которые продуцировали IL-2 специфично при инкубировании с пептидом, размножали и скринировали снова с FVIII (при 1 мкг/мл).

Клоны, которые вырабатывали IL-2 в ответ как на FVIII, так и на пептид, затем применяли для оценки того, являлись ли

модифицированные пептиды DNIMV и PRCLT апитопами, т.е. были ли они способны связываться с молекулой МНС и быть представленными Т-клетке как фиксированными, так и свежими АПК.

5×10^4 клеток гибридомы инкубировали с 5×10^4 свежих или фиксированных клеток MGAR и 10 мкг/мл пептида, 1 мкг/мл FVIII или сред в течение 48 часов. Затем супернатанты анализировали на IL-2 с применением ELISA. Результаты продемонстрированы для PRCLT на фиг.3а и для DNIMV на фиг.3б.

Все из меченых пептидов имели возможность быть представленными фиксированными антиген-представляющими клетками, что указывает на то, что все они являются апитопами подобно исходным пептидам PRCLT и DNIMV.

Пример 4: Т-клеточная устойчивость ex vivo

Для определения того, если модифицированные апитопы являлись способными к регулированию Т-клеточных ответов на исходные пептиды, самцов трансгенных мышей HLA-DR2 обрабатывали с 3×100 мкг пептида (пептиды SEQ ID No. 1, 2, 17 или 18) или PBS в качестве контроля и затем иммунизировали с каждым из исходных пептидов (PRCLT и DNIMV) в полном адъюванте Фрейнда. По прошествии десяти дней дренирующие лимфатические узлы и селезенки вырезали и стимулировали in vitro или с PRCLT, или с DNIMV. Результаты продемонстрированы на фиг.4 (PRCLT) и 5 (DNIMV). Лечение с модифицированными пептидами SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2 снижает Т-клеточные ответы на PRCLT, и лечение с модифицированными пептидами SEQ ID No. 17 или SEQ ID No. 18 снижает Т-клеточные ответы на DNIMV. Таким образом, модифицированные пептиды могут снижать иммунный ответ у мышей, иммунизированных с исходным пептидом.

Пример 5: Т-клеточная устойчивость ex vivo

Для того, чтобы определить то, распространялся ли эффект модифицированных апитопов на регулирование Т-клеточных ответов на исходные пептиды на регулирующие ответы на FVIII, самок трансгенных мышей HLA-DR2 обрабатывали с 3×100 мкг пептида (пептиды SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 17), и затем примировали с 100 мкг каждого из исходных пептидов (PRCLT и DNIMV) в полном

адъюванте Фрейнда. По прошествии десяти дней дренирующие лимфатические узлы отбирали и стимулировали *in vitro* или с PRCLT, DNIMV или с рекомбинантным FVIII. Результаты продемонстрированы на фиг.6. Пептид SEQ ID No 1 значительно ($p<0,01$) снижал Т-клеточный ответ на пептид PRCLT. Пептид SEQ ID No 17 значительно ($p<0,02$) снижал Т-клеточный ответ на DNIMV.

Пептид SEQ ID No. 1 регулировал ответы на PRCLT и пептид SEQ ID No. 17 регулировал ответы на DNIMV. Также имело место некоторое снижение, которое было незначительным, в ответ на FVIII с индивидуальными пептидами. Для усиления эффективности пептидов против иммунных ответов на FVIII в дальнейших экспериментах применяли комбинацию модифицированных DNIMV и модифицированных PRCLT.

Пример 6: Предотвращение выработки антитела с эскалацией дозы комбинации PRCLT и DNIMV модифицированных пептидов

Самцов трансгенных мышей HLA-DR2 обрабатывали с комбинацией пептида SEQ ID No. 1 и пептида SEQ ID No. 17 после протокола с эскалацией дозы. Шесть инъекций комбинации вводили в следующей дозе: 0,1; 1,0; 10 и 3×100 мкг (для каждого пептида в комбинации).

Затем животных примировали еженедельно с 1 мкг рекомбинантного человеческого FVIII и одновременным лечением (3 дня после иммунизирования rFVIII) с комбинацией пептидов SEQ ID No. 1/SEQ ID No. 17 (100 мкг каждого) и анализировали выработку анти-FVIII антител из образцов крови, отобранных после 4 и 8 иммунизирований FVIII (день 28, фиг.7a; день 56, фиг.7b, соответственно). Сыворотки титровали и анализировали прямым ELISA. Титр антитела для неиммунизированных мышей был негативным во всех случаях, тогда как анти-FVIII антитело считалось присутствующим в сыворотках обработанных мышей, когда соотношение связывания (с применением негативных сывороток для расчета соотношения) было больше чем 1,9. Результаты продемонстрированы на фиг.7a и b для дня 28 и дня 56 эксперимента, соответственно.

В дополнение, нейтрализующие FVIII антитела измеряли на день 56. Нейтрализующие FVIII антитела определяли с применением хромогенного способа. Кратко, образцы смешивали с 1 МЕ/мл FVIII и инициировали коагулирование добавлением FIX, FX, Тромбина, CaCl_2 и фосфолипидов. После инкубирования определяли количество выработанного FXa посредством добавления хромогенного субстрата S-2760 и измеряли OD сигнал. OD сигнал пропорционален FVIII активности в образцах, и его сравнивали с образцами, содержащими известное количество FVIII и не содержащими нейтрализующих антител. % оставшейся активности тестового образца рассчитывали по сравнению с контрольными образцами, и он выражен в подобных Бетезда единицах и показан на фиг.8. Мыши, обработанные с пептидами SEQ ID1 и SEQ ID17, имели значительно более низкий уровень нейтрализующего анти-FVIII антитела, чем мыши, обработанные с PBS.

Пример 7: Т-клеточная устойчивость ex vivo с применением эскалации дозы комбинации PRCLT и DNIMV модифицированных пептидов

Самцов/самок мышей DR2 обрабатывали с комбинацией пептидов SEQ ID No 1/SEQ ID No 17 после протокола с эскалацией дозы, как описано в примере 6.

Животных примировали с 100 мкг PRCLT и 100 мкг DNIMV в CFA. По прошествии десяти дней дренирующие лимфатические узлы клетки и спленоциты выделяли и повторно стимулировали in vitro с рекомбинантным человеческим FVIII.

Т-клеточные ответы оценивали анализами пролиферации (Фиг.9). Значительное снижение Т-клеточных ответов на FVIII было заметно для всех тестируемых концентраций FVIII, когда мышей обрабатывали с комбинацией пептидов SEQ ID No. 1 и SEQ ID No. 17.

Пример 8: Супрессия выработки нейтрализующего антитела с эскалацией дозы комбинации PRCLT и DNIMV модифицированных пептидов в терапевтической животной модели

Трансгенных мышей примировали с 3 мкг rFVIII в CFA и через три недели после иммунизирования обрабатывали с комбинацией пептида SEQ ID No. 1 и пептида SEQ ID No. 17 в соответствии с

протоколом с эскалацией дозы. Вводили шесть инъекций комбинации со следующей дозой: 0,1; 1,0; 10 и 3×100 мкг (для каждого пептида в комбинации). Контрольных животных обрабатывали с несвязанным с FVIII DR2-связывающим пептидом 133-152 простатической кислой фосфатазы (PAP) (последовательность, как описано в патенте PCT/US2006/031961, SEQ ID No. 15) с применением того же протокола с эскалацией дозы. Все животные получали бустер-иммунизацию с 3 мкг rhFVIII в IFA по прошествии пяти недель после rFVIII иммунизирования и через 4 дня после последнего цикла пептидного лечения. Выработку нейтрализующих антител анализировали в образцах плазмы, отобранных через 3 недели после первого FVIII иммунизирования и перед пептидным лечением, на неделе 5 (перед бустер-иммунизацией FVIII и после пептидного лечения) и во время периода последующего наблюдения на неделе 7, 9 и 13. Нейтрализующие FVIII уровни антител в образцах плазмы определяли, как описано в примере 6.

Результаты на фиг.10 демонстрируют, что лечение с пептидами SEQ ID No. 1 и SEQ ID No. 17 через три недели после иммунизирования с FVIII (неделя 3) значительно подавляет образование нейтрализующих анти-FVIII антител после бустер-иммунизации (Неделя 5) по сравнению с лечением с контрольным пептидом.

Все публикации, упомянутые в вышеприведенном описании, включены в данный документ посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и систем по изобретению будут очевидны специалисту в данной области без выхода за рамки объема и основной идеи изобретения. Хотя изобретение было описано с применением специфичных предпочтительных вариантов осуществления, необходимо понимать, что изобретение, как оно заявлено, не должно быть ненадлежащим образом ограничено такими специфичными вариантами осуществления. В действительности, подразумевается, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые являются очевидными для специалиста в молекулярной иммунологии или родственных областях, находятся в

рамках объема следующей формулы изобретения.

SEQ ID No.33

1 mqieltstcfff lclrlfcfsa tryylgave lswdymqsdl gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvykktlf vefthlfnfni akprppwmgl lgptiqaevy dtvvitlknm ashpvslhav
 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpq gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
 181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lhkfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
 241 aasarawpkm htvngyvnrslpgligchrk svywhvigmg tpevhsifl egthflvrnh
 301 rqaaleispi tfltaqtllm dlqqlfchfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlrmknne
 361 eaedydddltd semdvvrfd ddnspsfiqi rsvakkhpktd wvhyiaaeed dwdyaplvla
 421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
 481 liifknqasr pyniypghit dvrplysrll pkgvkhkldf pilpgeifky kwtvtvedgp
 541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde
 601 nrswylteni qrlfnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
 661 igaqtdflsv ffsgytfkhk mvyedtlitf pfsgetvfms menpglwlilg chnsdfrnrg
 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknnaieprs fsqnsrhpst rqqkfnatti
 781 pendiektdp wfahrtmpk iqnvsssdll mllrqsptph glslsdqlea kyetfsddps
 841 pgaidssnsl semthfrpql hhsqgdmvftp esglqlrlne klgttaatel kkldfkvsst
 901 snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmpv hydsqldtll fgkksplte sggplslsee
 961 nndskillesg lmnsgesswg knvsstesgr lfkgkrahgp alltkdnalf kvsislktn
 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkkt vtplihdrml mdknatalrl
 1081 nhmsnktts knmemvqqkk egpipppdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
 1141 qgspkqlvs lgpeksvegg nlfseknkvv vgkgeftkdv glkemvfpss nrlfntldn
 1201 lhennthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgtk nfmknlflls trqnvegsyd
 1261 gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtqiveky acttrispnt
 1321 sqqnfvtrqs kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
 1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrspia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpaaasy
 1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailtle mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp
 1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdlftets ngspghldlv egslqgteg aikwnearnp
 1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
 1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnpp vlkrhqreit rttlqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm sssphvlrnr
 1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtfrnqasr
 1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhsgl igpllchtn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
 1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsihfsg
 1981 vftvrkkeey kmalynlypg vftvemlps kagiwrvecl igeihlagms tflvysnkc

2041 qtplgmasgh irdfqitasg qygqwapkla rhysgsina wstkepfswi kvdlapmii
2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvtqgvksl ltsmyvkefl
2281 isssqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvnslppl ltrylrihpq swvhqialrm
2341 evlgceaql y

SEQUENCE LISTING

<110> Apitope International NV

<120> Peptides

<130> P046272PCT

<140> PCT/IB2013/060060

<141> 2013-11-11

<150> GB 1220328.7

<151> 2012-11-12

<150> GB 1316660.8

<151> 2013-09-19

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 1

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

Met	Glu	Gly	Lys	Lys
			20	

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 2

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

Met	Glu	Gly	Lys	Glu
			20	

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 3

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

Met Glu Gly Glu Lys
20

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 4

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

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 5

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

Met Glu Gly Lys Lys
20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 6

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

Met Glu Gly Lys Glu
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 7

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

Met Glu Gly Glu Lys
20

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 8

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

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 9

Lys Glu Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Lys Lys
20

<210> 10
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 10

Lys Glu Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Lys Glu
20

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 11

Lys Glu Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Glu Lys
20

<210> 12
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 12

Lys Glu Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 13

Glu Lys Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Lys Lys
20

<210> 14

<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 14

Glu Lys Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Lys Glu
20

<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 15

Glu Lys Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Glu Lys
20

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 16

Glu Lys Gly Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 17

Lys Lys Gly Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg

1 5 10 15

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 18

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 19

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

Pro Tyr Gly Glu Lys
20

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 20

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
20

<210> 21
<211> 21
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 21

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

Pro	Tyr	Gly	Lys	Lys
			20	

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 22

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

Pro	Tyr	Gly	Lys	Glu
			20	

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 23

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

Pro	Tyr	Gly	Glu	Lys
			20	

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 24

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
20

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 25

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

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 26

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 27

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

Pro Tyr Gly Glu Lys
20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 28

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
20

<210> 29
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 29

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

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 30

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 31

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

Pro Tyr Gly Glu Lys

<210> 32
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Modified FVIII-derived peptide sequence

<400> 32

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
 20

<210> 33
 <211> 2351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

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 2120	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser 2125	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys 2130	Trp	Gln	Thr	
Tyr 2135	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly 2140	Thr	Leu	Met	Val	Phe 2145	Phe	Gly	Asn
Val 2150	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys 2155	His	Asn	Ile	Phe	Asn 2160	Pro	Pro	Ile
Ile 2165	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu 2170	His	Pro	Thr	His	Tyr 2175	Ser	Ile	Arg
Ser 2180	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Trp 2185	Met	Gly	Cys	Asp	Leu 2190	Asn	Ser	Cys
Ser 2195	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu 2200	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser 2205	Asp	Ala	Gln
Ile 2210	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe 2215	Thr	Asn	Met	Phe	Ala 2220	Thr	Trp	Ser
Pro 2225	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His 2230	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser 2235	Asn	Ala	Trp
Arg 2240	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro 2245	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln 2250	Val	Asp	Phe
Gln 2255	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr 2260	Gly	Val	Thr	Thr	Gln 2265	Gly	Val	Lys
Ser 2270	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr 2275	Val	Lys	Glu	Phe	Leu 2280	Ile	Ser	Ser
Ser 2285	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp 2290	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln 2295	Asn	Gly	Lys
Val 2300	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn 2305	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr 2310	Pro	Val	Val
Asn 2315	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu 2320	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu 2325	Arg	Ile	His
Pro 2330	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln 2335	Ile	Ala	Leu	Arg	Met 2340	Glu	Val	Leu
Gly 2345	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu 2350	Tyr							

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

<400> 34

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

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

<400> 35

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

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<400> 36

Pro Arg Cys Leu Thr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide

<400> 37

Asp Asn Ile Met Val
1 5

<210> 38
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide general formula

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa may be Lys or Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(21)
<223> Xaa may be Lys or Glu

<400> 38

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

Pro Tyr Gly Xaa Xaa
20

<210> 39
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified FVIII-derived peptide general formula

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa may be Lys or Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(21)
<223> Xaa may be Lys or Glu

<400> 39

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

Met Glu Gly Xaa Xaa
20

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Control peptide 4Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N-terminal acetylation

<400> 40

Ala Ser Gln Tyr Arg Pro Ser Gln Arg
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий полученную из FVIII последовательность DNIMVTFRNQASRPY, где пептид (a) имеет формулу

XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX

где X представляет собой или лизин, или глутаминовую кислоту; и

(b) имеет одну из следующих последовательностей:

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 17)

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 18)

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKEK (SEQ ID No. 19)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 25)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 26)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKEK (SEQ ID No. 27)

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 29)

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 30) и

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKEK (SEQ ID No. 31).

2. Пептид, содержащий полученную из FVIII последовательность PRCLTRYSSFVNME, где пептид (a) имеет формулу

XXGPRCLTRYSSFVNMEGXX

где X представляет собой или лизин или глутаминовую кислоту; и (b) имеет одну из следующих последовательностей:

KKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 1)

KKGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 2)

KKGPRCLTRYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 3)

EEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 5)

EEGPRCLTRYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 7)

KEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 9)

KEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 10)

KEGPRCLTRYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 11) и

EKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 13).

3. Композиция, содержащая множество пептидов, включая один или более пептидов по п.1 или 2.

4. Композиция по п.3, которая содержит по меньшей мере один пептид по п.1 и по меньшей мере один пептид по п.2.

5. Композиция по п.4, которая содержит пептид, имеющий SEQ ID No. 1, и пептид, имеющий SEQ ID No. 17

6. Пептид по п.1 или 2, или композиция по любому из п.3-5, для применения в подавлении или предотвращении выработки ингибирующих фактор VIII антител *in vivo*.

7. Применение пептида по п.1 или 2, или композиции по любому из п.п.3-5, в получении лекарственного средства для подавления или предотвращения выработки ингибирующих фактор VIII антител *in vivo*.

8. Способ подавления или предотвращения выработки ингибирующих фактор VIII антител у пациента, который включает стадии введения пациенту пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из п.п.3-5.

9. Способ лечения гемофилии у пациента, который включает стадию введения пациенту пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из п.п.3-5.

10. Способ по п.8 или 9, где пациент имеет гемофилию А и подвергается или готовится к подверганию замещающей фактор VIII терапии и/или шунтирующей FVIII терапии.

11. Способ по п.8 или 9, где пациент имеет или подвержен риску заболевания приобретенной гемофилией.

12. Способ по любому из п.п.8-11, где пациент представляет собой HLA-DR2.

По доверенности

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ (СТАТЬЯ 34 РСТ)**

1. Пептид, содержащий полученную из FVIII последовательность DNIMVTFRNQASRPY, где пептид (a) имеет формулу

XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX

где X представляет собой или лизин, или глутаминовую кислоту; и

(b) имеет одну из следующих последовательностей:

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 17)

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 18)

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKEK (SEQ ID No. 19)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 25)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 26)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKEK (SEQ ID No. 27)

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 29)

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 30) и

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKEK (SEQ ID No. 31).

2. Пептид, содержащий полученную из FVIII последовательность PRCLTRYSSFVNME, где пептид (a) имеет формулу

XXGPRCLTRYSSFVNMEGXX

где X представляет собой или лизин, или глутаминовую кислоту; и (b) имеет одну из следующих последовательностей:

KKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 1)

KKGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 2)

KKGPRCLTRYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 3)

EEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 5)

EEGPRCLTRYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 7)

KEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 9)

KEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 10)

KEGPRCLTRYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 11) и

EKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 13).

3. Композиция, содержащая множество пептидов, включая один или более пептидов по п.1 или 2.

4. Композиция по п.3, которая содержит по меньшей мере

один пептид по п.1 и по меньшей мере один пептид по п.2.

5. Композиция по п.4, которая содержит пептид, имеющий SEQ ID No. 1, и пептид, имеющий SEQ ID No. 17

6. Пептид по п.1 или 2, или композиция по любому из п.п.3-5, для применения в подавлении или предотвращении выработки ингибирующих фактор VIII антител *in vivo*.

7. Применение пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из п.п.3-5, в получении лекарственного средства для подавления или предотвращения выработки ингибирующих фактор VIII антител *in vivo*.

8. Способ подавления или предотвращения выработки ингибирующих фактор VIII антител у пациента, который включает стадию введения пациенту пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из п.п.3-5.

9. Способ лечения гемофилии у пациента, который включает стадию введения пациенту пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из п.п.3-5.

10. Способ по п.8 или 9, где пациент имеет гемофилию А и подвергается или готовится к подверганию замещающей терапии с фактором VIII и/или FVIII шунтирующей терапии.

11. Способ по п.8 или 9, где пациент имеет или подвержен риску заболевания приобретенной гемофилией.

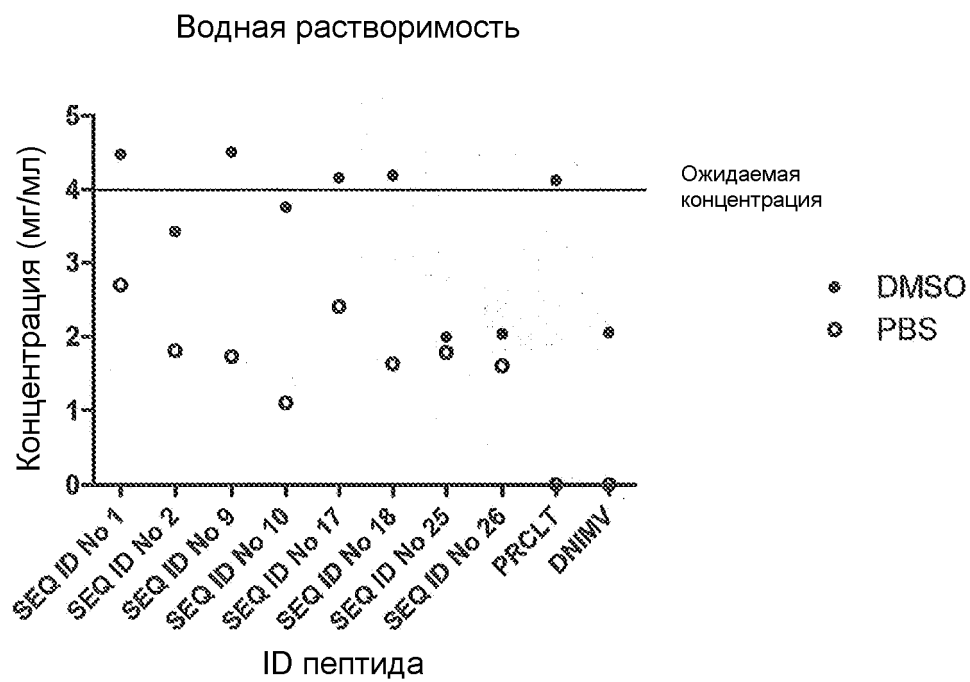
12. Способ по любому из п.п.8-11, где пациент представляет собой HLA-DR2.

По доверенности

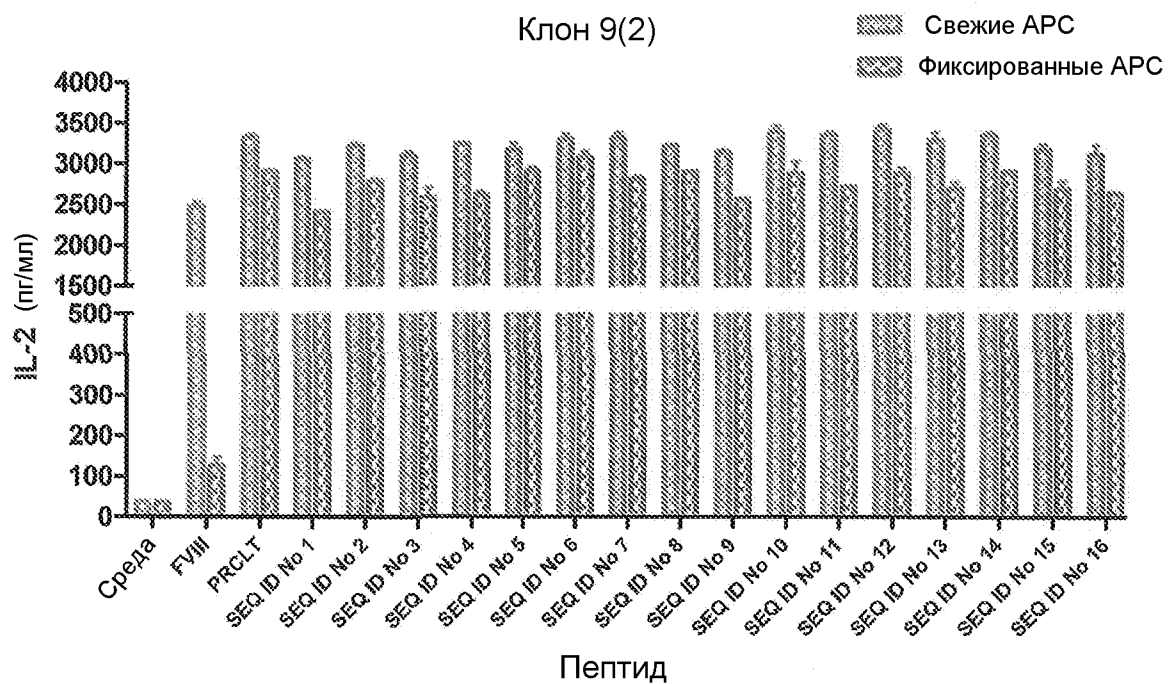
ФИГ. 1

	PRCLT	DNIMV	
KK-KK	1	18	Дальнейшее исследование
KK-KE	2	19	
KK-EK	3	20	
KK-EE	4	21	
EE-KK	5	22	Дальнейшее исследование
EE-KE	6	23	
EE-EK	7	24	
EE-EE	8	25	
KE-KK	9	26	Дальнейшее исследование
KE-KE	10	27	
KE-EK	11	28	
KE-EE	12	29	
EK-KK	13	30	
EK-KE	14	31	
EK-EK	15	32	
EK-EE	16	33	

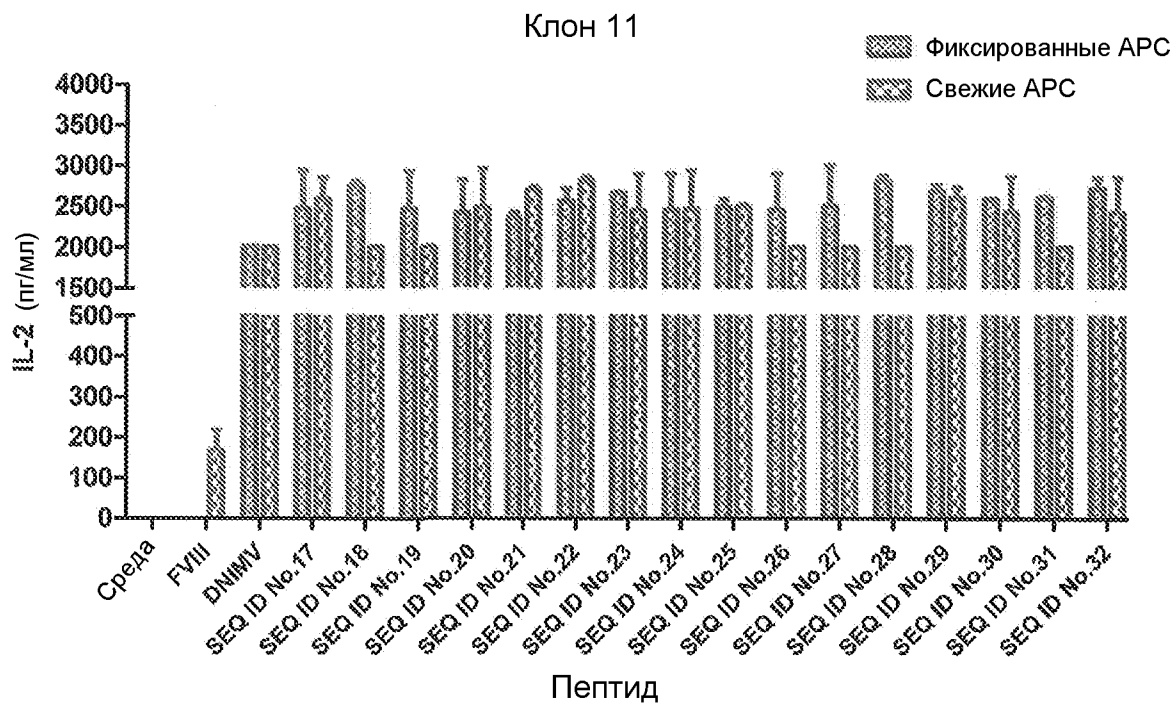
ФИГ. 2



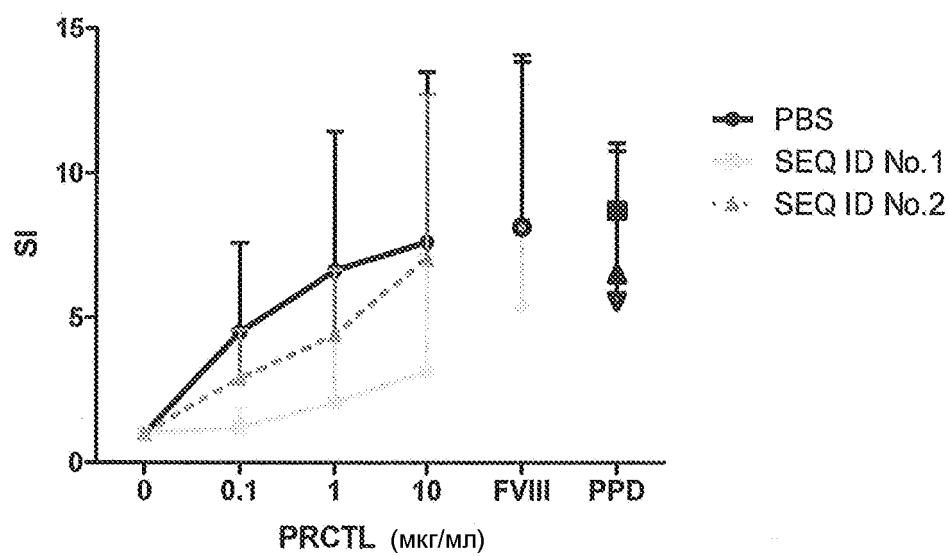
ФИГ. 3а



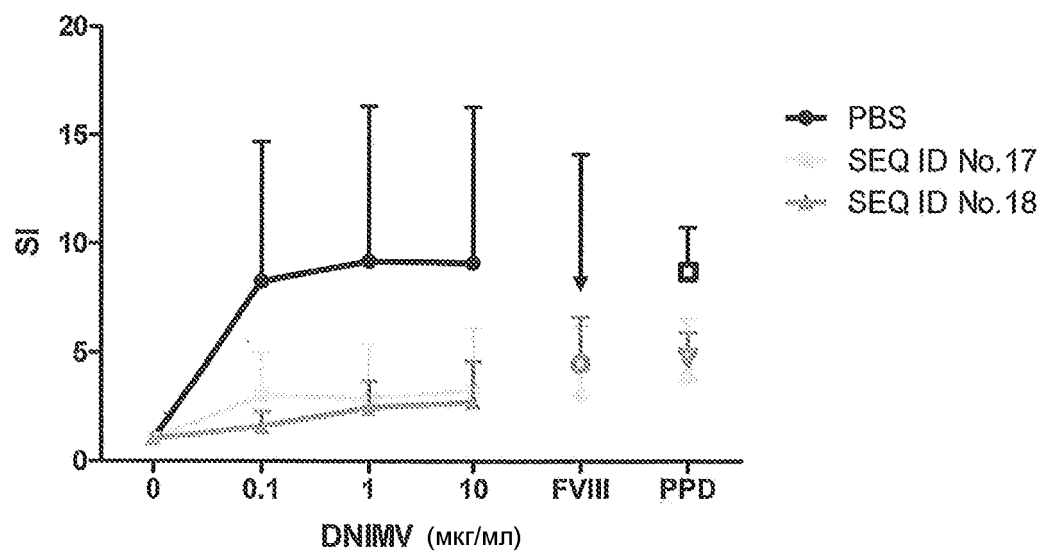
ФИГ. 3b



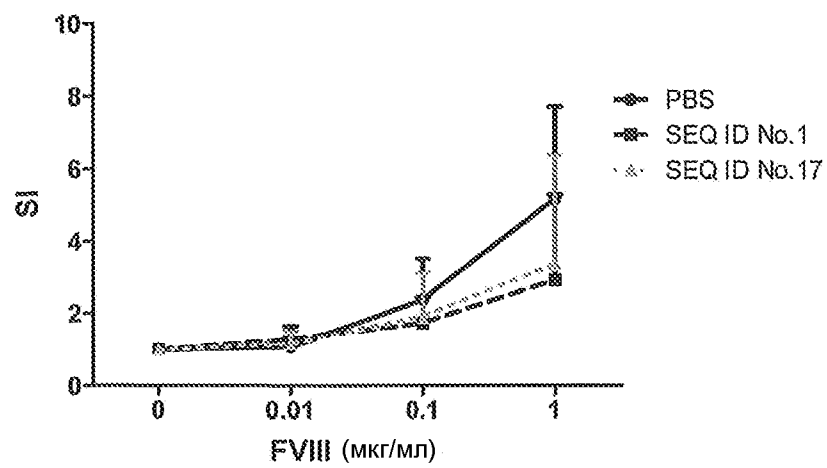
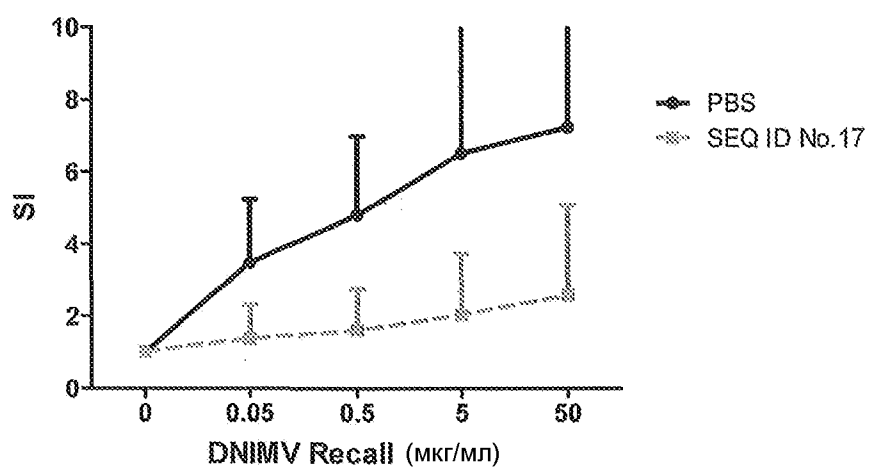
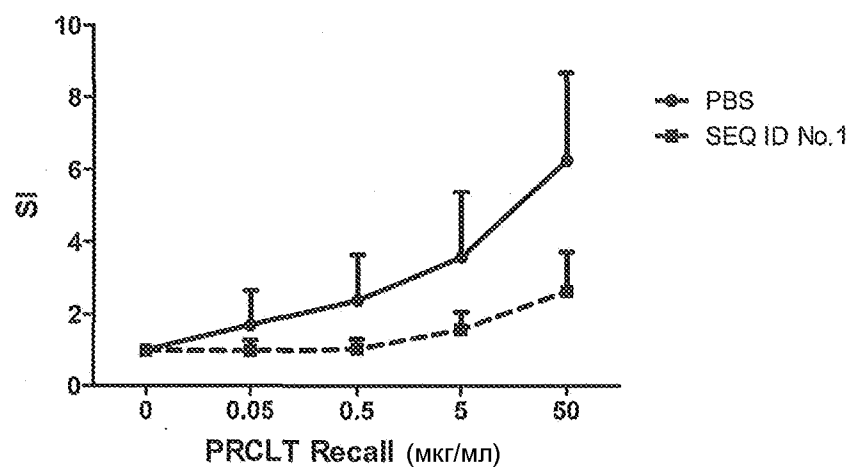
ФИГ. 4



ФИГ. 5

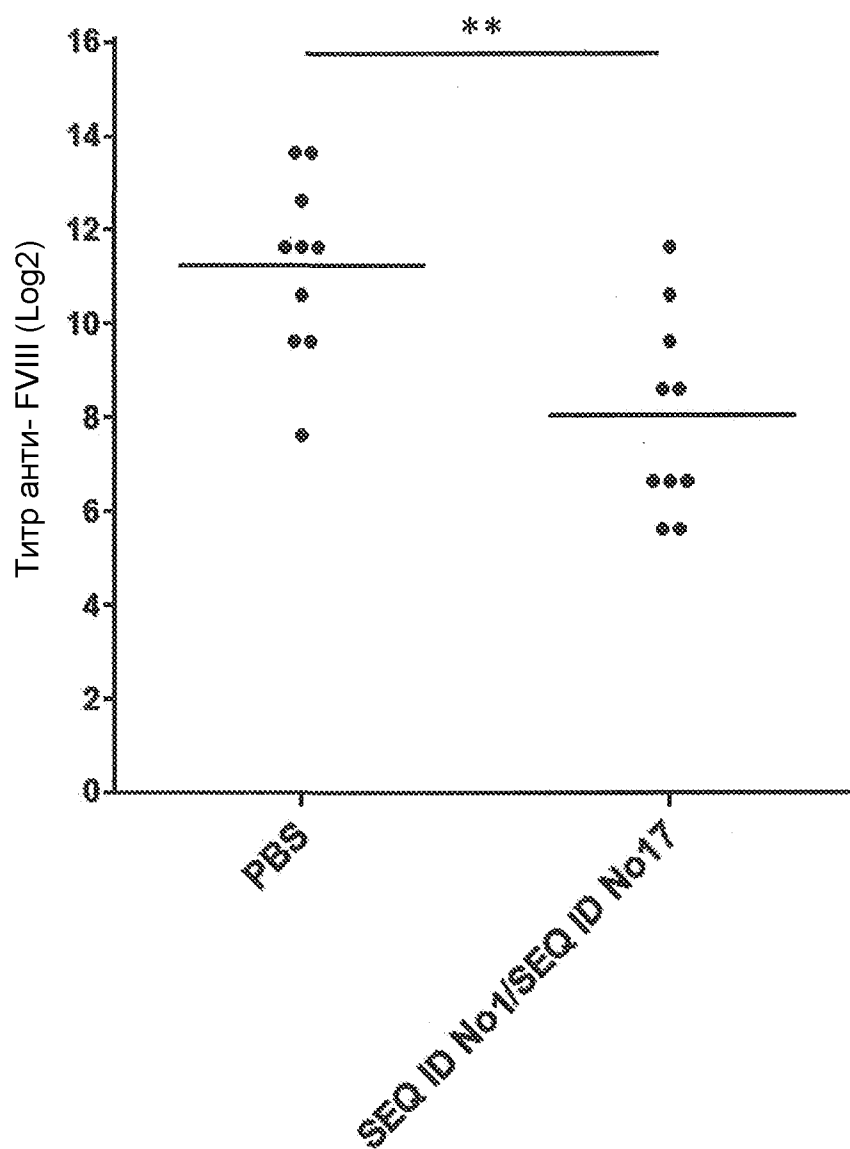


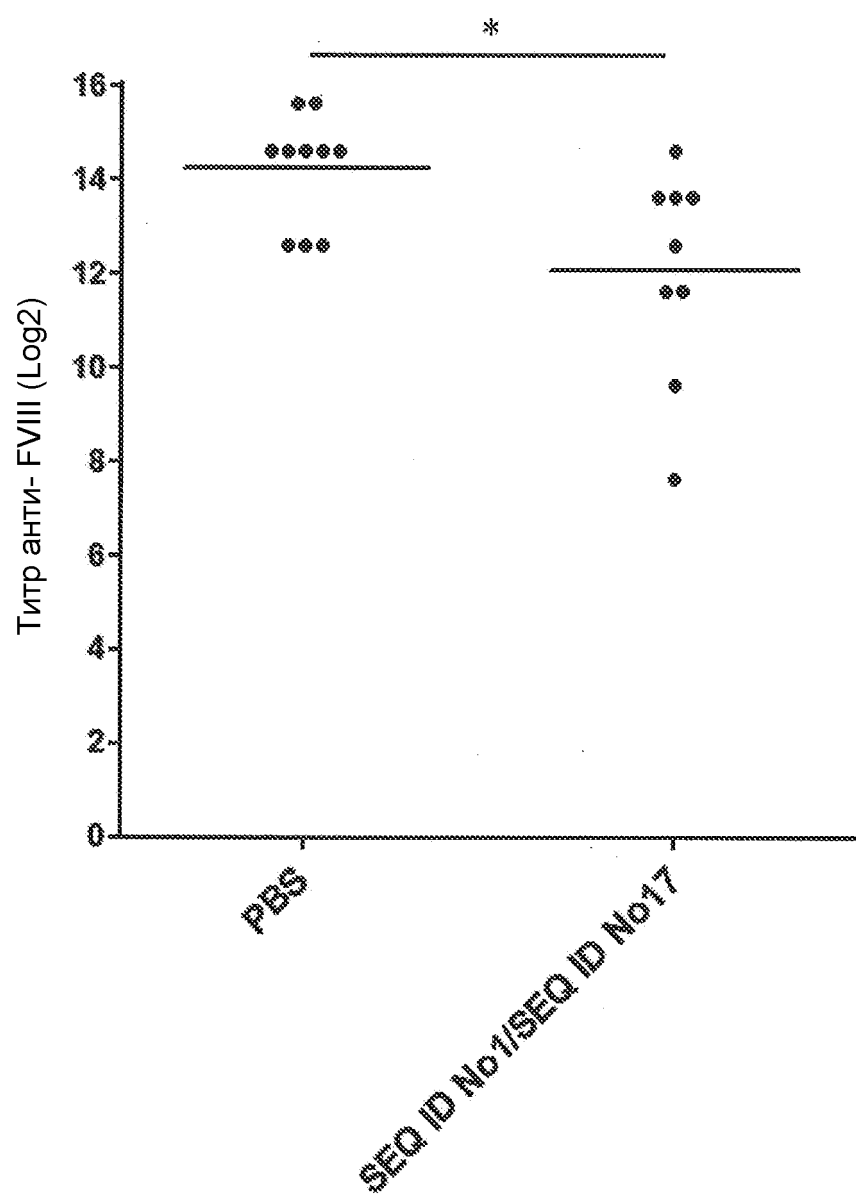
ФИГ. 6



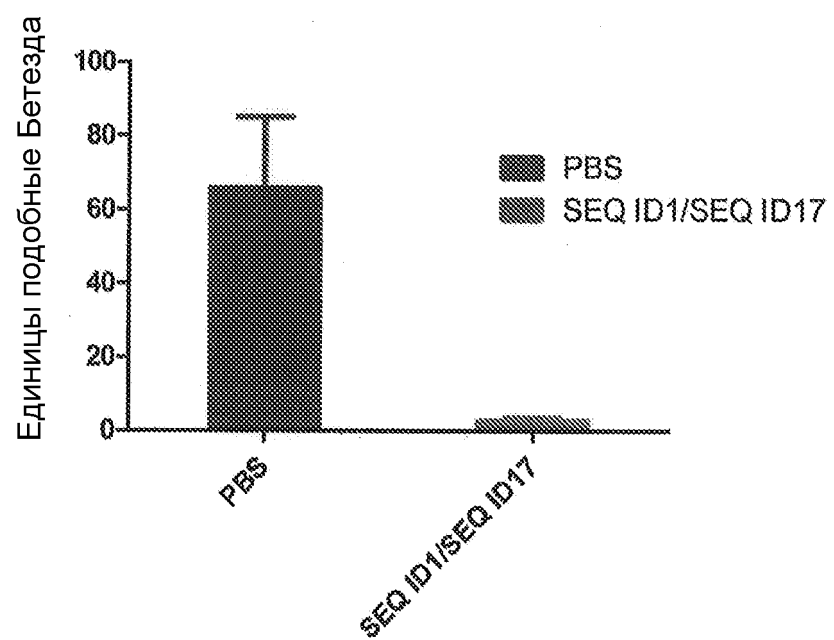
Фиг. 7

ФИГ. 7a : Титр анти- FVIII антитела на день 28

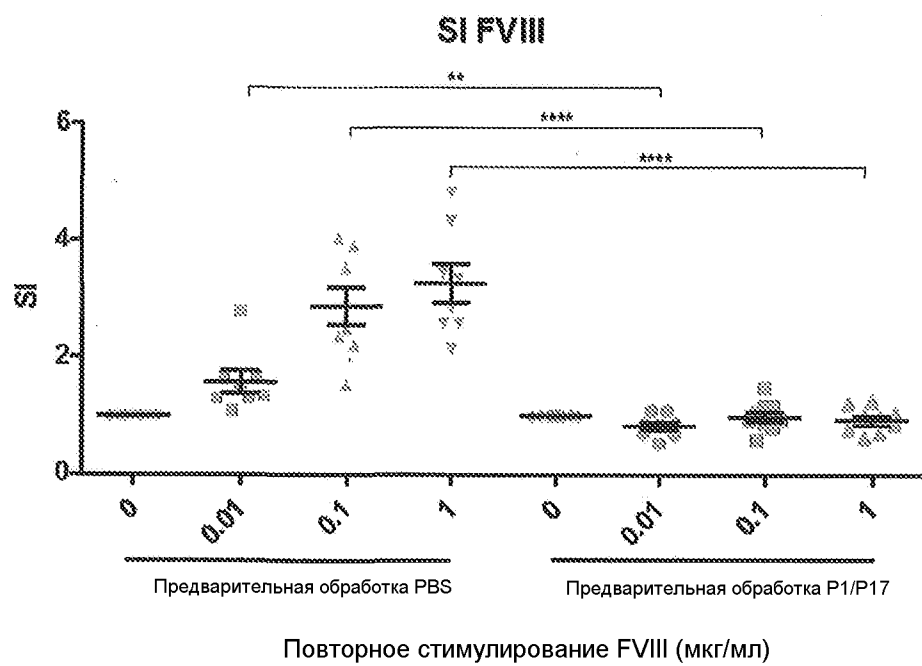


ФИГ. 7b: Титр анти-FVIII антитела на день 56:

ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

