

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036483**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- | | |
|---|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.16 | (51) Int. Cl. <i>C07K 14/755</i> (2006.01)
<i>A61K 38/00</i> (2006.01)
<i>A61K 39/00</i> (2006.01)
<i>A61K 38/37</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201590927 | |
| (22) Дата подачи заявки
2013.11.11 | |

(54) ПЕПТИДЫ, СПОСОБНЫЕ ИНДУЦИРОВАТЬ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К РЕКОМБИНАНТНОМУ FVIII, СОДЕРЖАЩАЯ ИХ КОМПОЗИЦИЯ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

- | | |
|---|------------------------------|
| (31) 1220328.7; 1316660.8 | (56) WO-A2-2010133834 |
| (32) 2012.11.12; 2013.09.19 | WO-A2-2009095646 |
| (33) GB | FR-A1-2842812 |
| (43) 2015.10.30 | WO-A1-2009071886 |
| (86) PCT/IB2013/060060 | |
| (87) WO 2014/072958 2014.05.15 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭПИТОП ИНТЕРНЭШНЛ НВ (BE) | |
| (72) Изобретатель:
Рэйт Дэвид, Стритер Хитер (GB) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

(57) Настоящее изобретение относится к пептидам, способным индуцировать толерантность к рекомбинантному FVIII, способным связываться с молекулой МНС класса I или II и презентироваться Т-клетке без дополнительного процессинга, содержащим последовательность XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX или XXGPRCLTRYYSFVNMEGXX. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей заявленные пептиды, к применению заявленных пептидов или композиции для подавления или предотвращения выработки ингибирующих FVIII антител in vivo и соответствующему способу, а также к способу лечения гемофилии у пациента, включающему стадию введения пациенту пептида или композиции по изобретению.

B1

036483

036483

B1

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 покрытием поврежденной области (например, пластырем).

Главной проблемой является внутреннее кровотечение в суставы, мышцы и мягкие ткани, что может происходить самопроизвольно. Внутреннее кровотечение, например кровоизлияние 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 протромбина (FEIBA™) 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, которые неспецифично метят 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).

Приобретенная 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, циклофосфамида, 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, способному индуцировать толерантность к рекомбинантному FVIII, способному связываться с молекулой МНС класса I или II и презентироваться Т-клетке без дополнительного процессинга, содержащему полученную из FVIII последовательность DNIMVTFRNQASRPY, где пептид

(а) 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)
 KKGDNIMVTFRNQASRPYG EK (SEQ ID No. 19)
 KEGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 25)
 KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 26)
 KEGDNIMVTFRNQASRPYG EK (SEQ ID No. 27)
 EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 29)
 EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 30) и
 EKGDNIMVTFRNQASRPYG EK (SEQ ID No. 31).

Во втором варианте осуществления изобретение относится к пептиду, способному индуцировать толерантность к рекомбинантному FVIII, способному связываться с молекулой МНС класса I или II и презентироваться Т-клетке без дополнительного процессинга, содержащему 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)
 KKGPRCLTRYSSFVNMEG EK (SEQ ID No. 3)
 EEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 5)
 EEGPRCLTRYSSFVNMEG EK (SEQ ID No. 7)
 KEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 9)
 KEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 10)
 KEGPRCLTRYSSFVNMEG EK (SEQ ID No. 11) и
 EKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 13).

Во втором аспекте изобретение относится к композиции, содержащей один или несколько 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.

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

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

Настоящее изобретение также относится к способу подавления или предотвращения 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 то-

лерантность антигена. На диаграмме диагональной штриховкой представлен пептид, который является, по меньшей мере, настолько же растворимым, как 4Y, незакрашенная ячейка представляет пептид, который является не точно настолько же растворимым, как 4Y, но очень близок к этому, и диагональным пунктиром представлен пептид, который является не настолько же растворимым, как 4Y. Пептиды, обозначенные диагональной штриховкой, являлись настолько же растворимыми, как контрольный пептид 4Y, пептиды, обозначенные диагональным пунктиром, являлись плохо растворимыми, и один пептид, обозначенный не закрашенной ячейкой, 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, действительно ли меченые пептиды, подобно исходным пептидам PRCLT и DNIMV, способны к связыванию с молекулой МНС и к представлению Т-клетки 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 ID 1, или SEQ ID 17, или контролем (PBS), 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. 7a: 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 кислотной фосфатазы (PAP) (последовательность, как описано в PCT/US 2006/031961, SEQ ID NO: 15), после индуцирования иммунного ответа на FVIII и выработки анти-FVIII антитела. Мыши получали пептидное лечение через три недели после иммунизирования gFVIII и перед бустер-иммунизацией с gFVIII. 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 43 1 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 мин, 30 мин, 4 ч или 24 ч.

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 адаптивном 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, возможна 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 изобретения 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 специфических 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 аминокислотами в длину, более часто между 10 и 17 аминокислотами в длину и могут быть длиннее (например, вплоть до 40 аминокислот). Эти пептиды располагаются в вытянутой 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 PRCLTRYSSFNME 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 PRCLTRYSSFNME, 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 a, 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
PRCLTRYSSFVNME

Уже было продемонстрировано, что эти пептиды действуют в качестве эпитопов и являются толерогенными *in vivo* (см. примеры и международную заявку на патент PCT/GB 2008/003996).

После этого было обнаружено, что растворимость является важным фактором в пептидопосредованной индукции устойчивости.

Авторы данного изобретения 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 DNIMV и PRCLT.

Пептиды по данному изобретению имеют общую формулу

XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX или

XXGPRCLTRYSSFVNMEGXX

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, 1 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 адьювантом.

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 T-лимфоцитов к апоптической клеточной смерти в тимусе (центральная устойчивость). Однако не все собственные антигены детектируемы в тимусе, так что смерть аутореак-

тивных 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 по меньшей мере в 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 отсутствие 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 изобретения 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 ко-стимуляции, 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;
- (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 PRCLTRYSSSFVNME.

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 в виду, 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 инъекционного 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 рН агенты. Буферизующие соли включают в себя фосфат, цитрат, ацетат, для доведения рН 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 лиофилизованного (высушенного замораживанием)

ванием) порошка. Лиофилизация позволяет длительное хранение в стабилизированной форме. Процедуры лиофилизации хорошо известны в данной области, см., например, <http://www.device-link.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, подязычного, внутриносового, внутрикожного или суппозиторного путей или имплантации (например, с применением молекул с замедленным высвобождением).

Композиция может быть предпочтительно введена через внутриносовую, подкожную или внутрикожную 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 предпочтительном 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, заключающимся 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% 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. Технологии очистки моноклонального антитела, инактивация нагреванием и обработка вирицидным 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, 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.

Приобретенная 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 приобретенными 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 PRCLTRY-YSSFVNME ("PRCLT") и 16 которых были основаны на FVIII пептиде DNIMVTFRNQASRPY ("DNIMV"). Все пептиды приведены в табл. 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 ч для предоставления возможности образования осадка и затем центрифугировали при 14800 об/мин в течение 10 мин 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 мин. 10 мкл образца отбирали из верхней части каждого раствора, 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 гибридных клеток с 5×10^4 DR2-позитивных антиген-представляющих клеток (клеточная линия MGAR) и 10 мкг/мл PRCLT/DNIMV или среды в течение 48 ч. 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 MHC и быть представленными T-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 ч. Затем супернатанты анализировали на IL-2 с применением ELISA. Результаты продемонстрированы для PRCLT на фиг. 3a и для DNIMV на фиг. 3b.

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. T-клеточная устойчивость *ex vivo*.

Для определения того, если модифицированные апитопы являлись способными к регулированию T-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 адьюванте 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 T-клеточные ответы на PRCLT, лечение с модифицированными пептидами SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18 снижает T-клеточные ответы на DNIMV. Таким образом, модифицированные пептиды могут снижать иммунный ответ у мышей, иммунизированных с исходным пептидом.

Пример 5. T-клеточная устойчивость *ex vivo*.

Для того чтобы определить то, распространялся ли эффект модифицированных апитопов на регулирование T-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 адьюванте 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 T-клеточный ответ на пептид PRCLT. Пептид SEQ ID NO: 17 значительно ($p < 0,02$) снижал T-клеточный ответ на DNIMV.

Пептид SEQ ID NO: 1 регулировал ответы на PRCLT, 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 одно-временным 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, CaCl₂ 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. Процент 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 ID 1 и SEQ ID 17, 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 мышью 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/US 2006/031961, 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 mqieltcfff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdg gelpvdarfp prvpksfpfn
61 tsvvykktlf veftdhlfni akprppwmgf lqptiqaevy dtvvtlknm ashpvslhav
121 gvsywcaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpq gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkshwse tknslmqdrd
241 aasarawpkm htvnqyvnrslpgligchrk svywhvigmg tpevhsifl eghtflvrnh
301 rqaaleispi tftaqtllm dlqqlfch isshqhdgme ayvkvdscpe epqlrmknne
361 eaedydddlt dsemdvvrfd ddnspsfqi rsvakhhpkt wvhyaeeee dwdyaplva
421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdefktrea iqhesgilgp llygevgdtl
481 liifknqasr pyniypgfit dvrplysrrl pkgvkhkdf pilpgeifky kwvtvvedgp
541 tksdprcltr yysfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde
601 nrsywlteni qrflpnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
661 igaqtdflsv fsgytfkhk mvyedtlfl pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrng
721 mtalkvssc dkntgdyyed syedisayll sknnaieprs fsqnsrhpst rqqqnatti
781 pendiektqp wfahrtmpk iqnvssdll mlrqspth glslsdlqea kyetfsddps
841 pgaidnnsf semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrln klgtaatel kklfdkvsst
901 snnlistips dnlaagdnt sslgppsmv hydsqldtl fgkksplte sggplisee
961 nndsklesg lmnseqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefk vtplihdrml mdknatalrl
1081 nhmsnktss knmemvqqk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
1141 qgppskqlvs lgpeksvegq nlfseknkv vgkgeftkdv glkemvfpss nlfiltldn
1201 lhennthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknlflls trqnvegsyd
1261 gayapvlqdf rslndstnr kkhtahfskk geeenlegl nqtkqiveky acttrispnt
1321 sqqnfvtqrs kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrsplia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpaaasy
1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailtle mtgdqrevgs lqtsatnsvt ykkventvlp
1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdlftets ngspghdlv egslqgteg aikwneanrp
1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
1621 nacesnhaia ainegnkpe ievtwakqr terlcsqnp vlkrhqreit rttlqsdqee
1681 idyddtisve mkkedfdiy edenqsprsf qkkrhyfia averlwdygm sssphvlrn
1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtfmqasr
1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpe tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
1861 dlekdvhsyl igpllvchn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngymdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsifsgn
1981 vftvrkkeey kmalynlypg vftvempk kagiwrvecl igehlhagms tflvysnkc

2041 qtplgmasgh irdfqitasg qyggwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdlIapmii
 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
 2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqtkmktv gvttgvyksl ltsmyvkefl
 2281 isssqdghqw tfffqngkvk vfqgnqdsft pvvnslppl ltrylrihpq swvhqialrm
 2341 evlgceaqdl y

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, способный индуцировать толерантность к рекомбинантному FVIII, способный связываться с молекулой МНС класса I или II и презентироваться Т-клетке без дополнительного процессинга, содержащий полученную из FVIII последовательность DNIMVTFRNQASRPY, причем 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),

KKGDNIMVTFRNQASRPYGK (SEQ ID NO: 19),

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID NO: 25),

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID NO: 26),

KEGDNIMVTFRNQASRPYGK (SEQ ID NO: 27),

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID NO: 29),

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID NO: 30) или

EKGDNIMVTFRNQASRPYGK (SEQ ID NO: 31).

2. Пептид, способный индуцировать толерантность к рекомбинантному FVIII, способный связываться с молекулой МНС класса I или II и презентироваться Т-клетке без дополнительного процессинга, содержащий полученную из FVIII последовательность PRCLTRYSSFVNME, причем 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),

KKGPRCLTRYSSFVNMEGK (SEQ ID NO: 3),

EEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 5),

EEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID NO: 7),

KEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 9),

KEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID NO: 10),

KEGPRCLTRYSSFVNMEGK (SEQ ID NO: 11) или

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID NO: 13).

3. Композиция, содержащая один или несколько пептидов по п.1 и/или 2, для подавления или предупреждения выработки ингибирующих FVIII антител *in vivo*.

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

5. Композиция по п.4, содержащая пептид, имеющий SEQ ID NO: 1, и пептид, имеющий SEQ ID NO: 17.

6. Применение пептида по п.1 или 2 для подавления или предотвращения выработки ингибирующих FVIII антител *in vivo*.

7. Применение композиции по любому из пп.3-5 для подавления или предотвращения выработки ингибирующих FVIII антител *in vivo*.

8. Применение пептида по п.1 или 2 в получении лекарственного средства для подавления или предотвращения выработки ингибирующих FVIII антител *in vivo*.

9. Применение композиции по любому из пп.3-5 в получении лекарственного средства для подавления или предотвращения выработки ингибирующих FVIII антител *in vivo*.

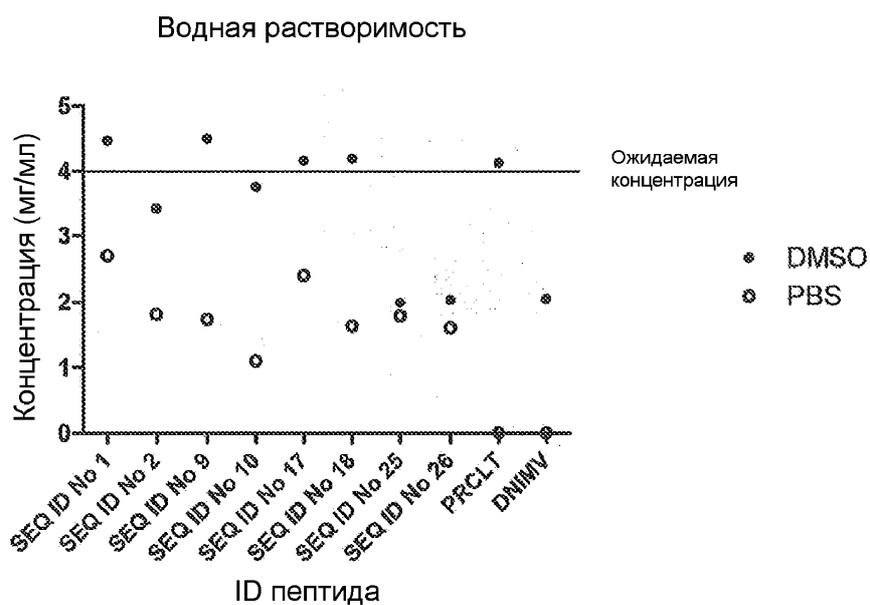
10. Способ подавления или предотвращения выработки ингибирующих FVIII антител у пациента, включающий введение пациенту пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из пп.3-5.

11. Способ лечения или профилактики приобретенной гемофилии у пациента, включающий введение пациенту пептида по п.1 или 2 или композиции по любому из пп.3-5.

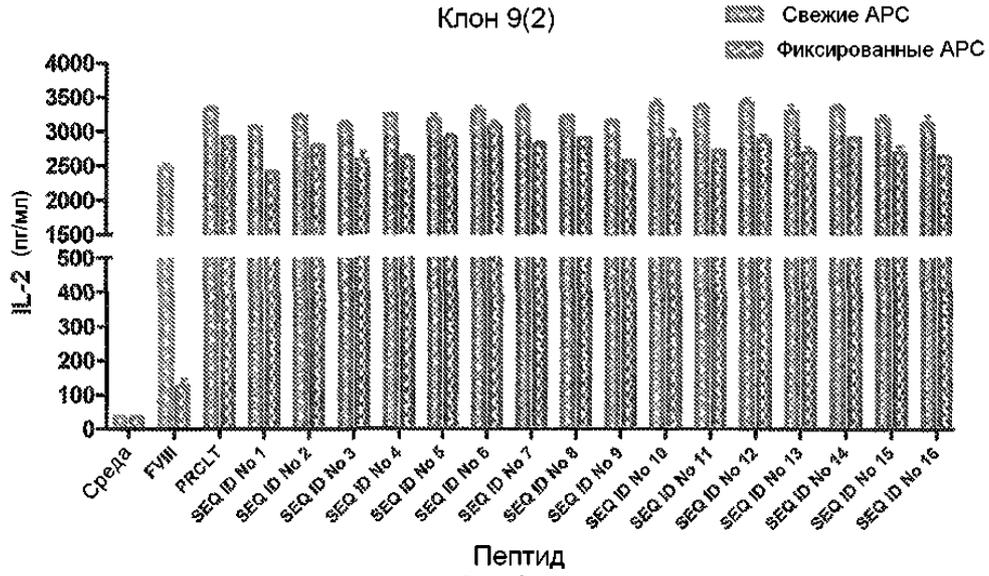
12. Способ по п.10 или 11, где пациент имеет гемофилию А и подвергается или готовится к замещающей терапии с FVIII и/или шунтирующей FVIII терапии.
13. Способ по любому из пп.10-12, где пациент является позитивным по HLA-DR2.

	PRCLT	DNIMV	
KK-KK	1	17	→ → → → Дальнейшее исследование
KK-KE	2	18	
KK-EK	3	19	
KK-EE	4	20	
EE-KK	5	21	→ → → → → → → → Дальнейшее исследование
EE-KE	6	22	
EE-EK	7	23	
EE-EE	8	24	
KE-KK	9	25	
KE-KE	10	26	
KE-EK	11	27	
KE-EE	12	28	
EK-KK	13	29	
EK-KE	14	30	
EK-EK	15	31	
EK-EE	16	32	

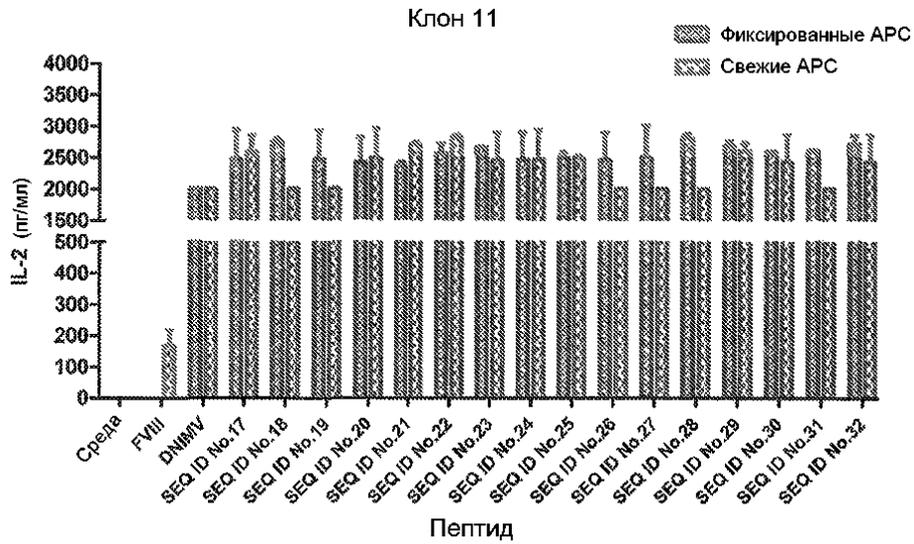
Фиг. 1



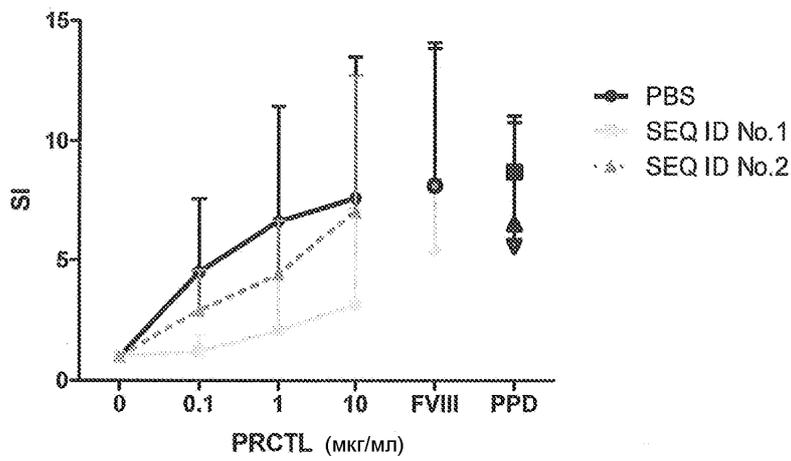
Фиг. 2



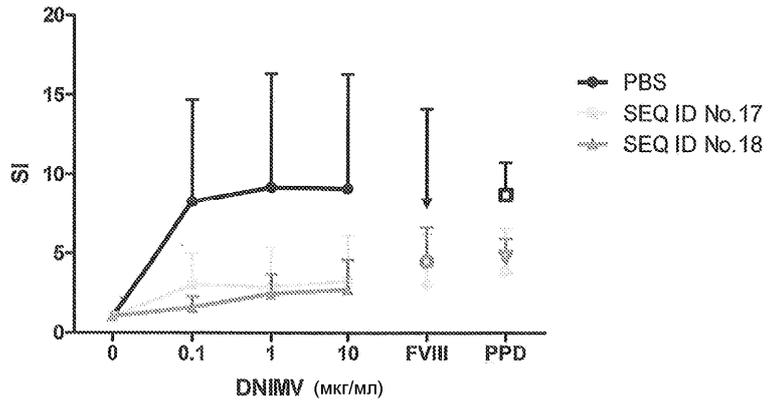
Фиг. 3а



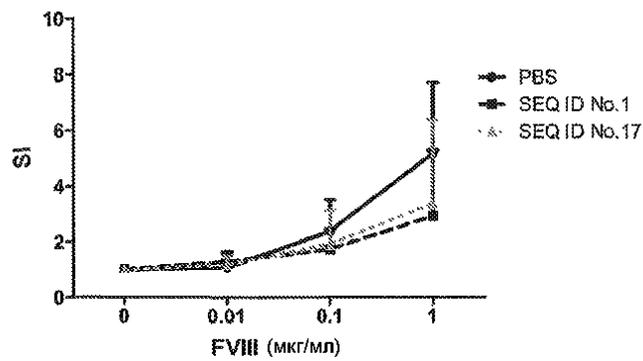
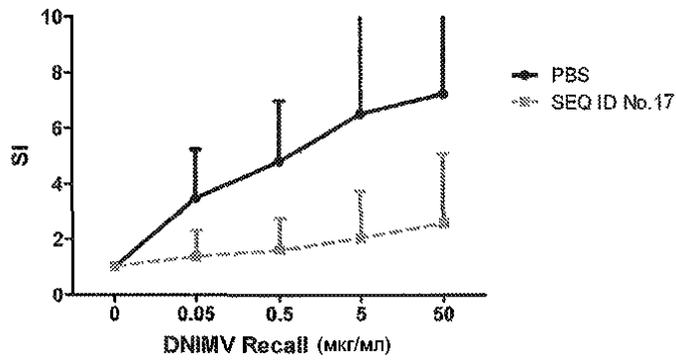
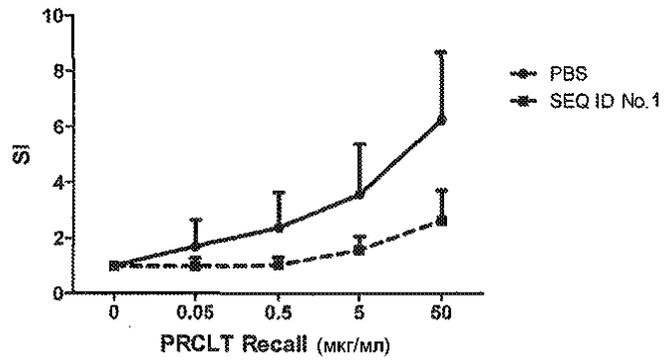
Фиг. 3б



Фиг. 4

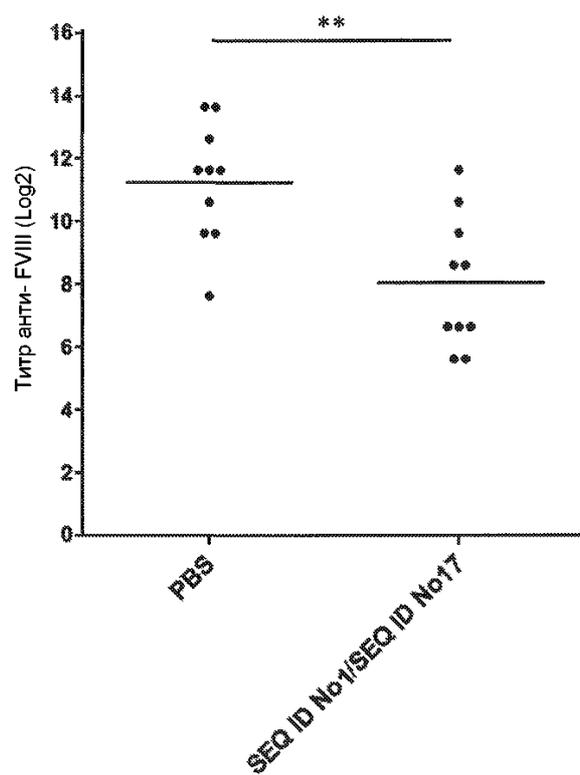


Фиг. 5



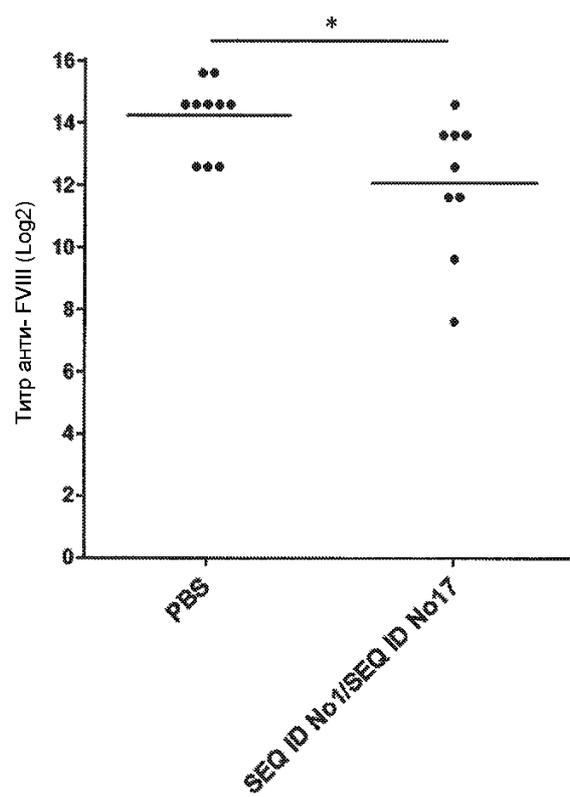
Фиг. 6

Титр анти- FVIII антитела на день 28

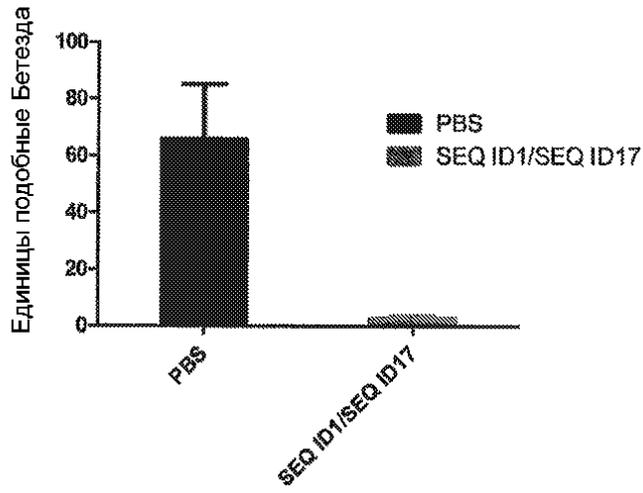


Фиг. 7а

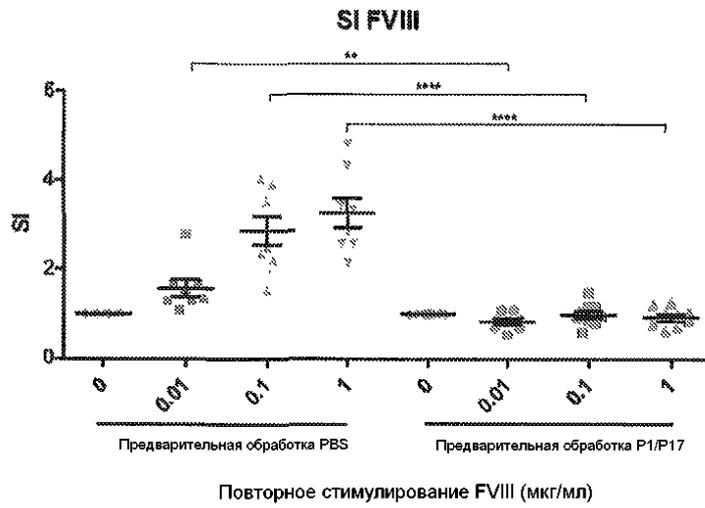
Титр анти-FVIII антитела на день 56:



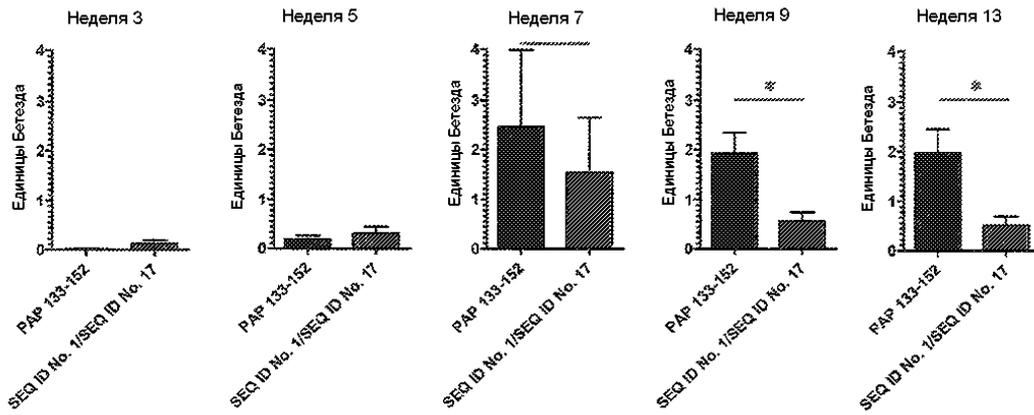
Фиг. 7б



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

