

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 315**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008** **E 08855772 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 2227488**

54 Título: **Péptidos de FVIII y su uso en la inducción de tolerancia en pacientes hemofílicos**

30 Prioridad:

04.12.2007 GB 0723712

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2014

73 Titular/es:

APITOPE INTERNATIONAL NV (100.0%)
Agoralaan, geb. A bis
3590 Diepenbeek, BE

72 Inventor/es:

WRAITH, DAVID

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 458 315 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de FVIII y su uso en la inducción de tolerancia en pacientes hemofílicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un péptido. En particular, se refiere a péptidos que pueden derivarse del factor VIII (FVIII). Los péptidos pueden usarse para reducir o prevenir la formación de anticuerpos inhibidores contra el factor VIII, por ejemplo en el tratamiento de hemofilia A y hemofilia adquirida.

10

Antecedentes de la invenciónHemofilia

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

20 En la hemofilia, la capacidad de la sangre para coagularse se ve gravemente reducida debido a que falta parcial o completamente un factor de coagulación esencial, dando como resultado un aumento del tiempo de hemorragia. La hemofilia A es una deficiencia del factor de coagulación VIII, mientras que la hemofilia B es una deficiencia del factor de coagulación IX. En ambas enfermedades, el gen defectuoso se encuentra en el cromosoma X, de modo que los estados están ligados al cromosoma X. La hemofilia A es cinco veces más común que la hemofilia B.

25 La hemofilia es un estado genético hereditario que dura toda la vida, que afecta a mujeres como portadoras y a hombres que heredan el estado. Aproximadamente una tercera parte de los nuevos diagnósticos son en casos en los que no hay una historia familiar previa. Aparece en todo el mundo y se produce en todos los grupos raciales. Aproximadamente 6.000 personas están afectadas con hemofilia en el R.U.

30 Los pacientes hemofílicos presentan hemorragia durante un periodo prolongado tras una lesión. Las lesiones externas tales como cortes y rasguños no plantean habitualmente problemas graves: a menudo es posible detener la hemorragia aplicando cierto grado de presión y cubriendo la zona afectada (por ejemplo, con un apósito).

35 El principal problema es la hemorragia interna en articulaciones, músculos y tejidos blandos, que puede producirse espontáneamente. La hemorragia interna, tales como hemorragias en el cerebro, es muy difícil de manejar y puede ser mortal. La hemorragia repetida en las articulaciones produce dolor agudo y puede producir artritis y/o daño articular a largo plazo que conduce a incapacidad.

40 El tratamiento para la hemofilia es habitualmente mediante sustitución del factor de coagulación que falta. En hemofilia leve o moderada, pueden administrarse inyecciones en el momento en que se produce una hemorragia (terapia a demanda). Sin embargo, en hemofilia grave, se administran inyecciones profilácticas regulares para ayudar a que se coagule la sangre y minimizar la probabilidad de daño articular a largo plazo.

45 Una complicación potencialmente grave de la terapia de sustitución de factores de coagulación para la hemofilia A es el desarrollo de anticuerpos que neutralizan la función procoagulante del factor VIII. Los inhibidores del factor VIII se producen en aproximadamente el 25% de los pacientes con hemofilia A grave. Puesto que los pacientes con hemofilia A congénita pueden ser genéticamente deficientes en FVIII, la síntesis de inhibidores es una respuesta aloinmunitaria frente a la proteína foránea administrada para prevenir o tratar episodios hemorrágicos.

50 Las células T CD4+ desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria frente a FVIII. Tras captarse por células presentadoras de antígeno (CPA), FVIII experimenta degradación proteolítica para dar fragmentos peptídicos (Reding *et al* (2006) Haemophilia 12(sup. 6) 30-36). Estos péptidos se presentan entonces en la superficie de la CPA en asociación con moléculas de CMH de clase II. Este complejo lo reconoce entonces el receptor de células T de una célula CD4+ específica para FVIII. En presencia de las señales coestimuladoras apropiadas, este reconocimiento provoca en última instancia que la célula CD4+ dirija la síntesis de anticuerpos por células B. El documento WO 02/060917 proporciona un método terapéutico que comprende la administración de al menos un péptido epitópico que comprende una secuencia de epítipo universal y/o inmunodominante de una parte (fragmento) del factor VIII a un mamífero que necesita tal tratamiento.

60 La incidencia de formación de inhibidores aumenta inicialmente con el número de tratamientos con factor VIII, pero parece alcanzar una meseta tras 50-100 días de exposición. La formación de inhibidores es mucho más común en hemofilia grave que en la enfermedad moderada o leve y algunos defectos moleculares, lo más claramente grandes deleciones y mutaciones sin sentido en la cadena ligera del factor VIII, parecen predisponer a la formación de inhibidores. Parámetros tales como la concentración, el tipo (purificado o recombinante) del factor de sustitución, y el historial de tratamientos también pueden afectar a la probabilidad de producción de anticuerpos.

65

El manejo de pacientes con hemofilia con inhibidores es un reto continuo. La inducción de tolerancia inmunitaria (ITI)

usando una técnica de desensibilización es satisfactoria en algunos pacientes con aloanticuerpos contra el factor VIII. Este enfoque terapéutico requiere la exposición continua a la terapia de sustitución de factor, de modo que es una estrategia a largo plazo.

5 Aunque la ITI puede ser satisfactoria, una proporción significativa (aproximadamente el 30%) de los pacientes no responde a la ITI. Es mucho menos probable que los pacientes con altos títulos de inhibidor respondan al tratamiento. Otro factor contribuyente significativo es la edad al inicio cuando se comienza la ITI, con tasas de éxito enormemente disminuidas cuando el paciente tiene más de 20 años (Hay *et al* (2005) Seminars in Thrombosis and Hemostasis 32:15-21).

10 Cuando la terapia con ITI es insatisfactoria, el inhibidor persiste generalmente durante toda la vida, y debido a que tales pacientes son habitualmente pacientes de alta respuesta, es necesario tratar episodios de hemorragia con productos de desvío de FVIII, tales como concentrados de complejo de protrombina activada (FEIBA™) y FVII activado recombinante. Sin embargo, el uso de tales agentes está asociado con acontecimientos adversos tales como coagulación intravascular diseminada, infarto agudo de miocardio, émbolo pulmonar y trombosis (Acharya y DiMichele (2006) Best Practice & Research Clinical Haematology 19:51-66).

15 A veces se usa la terapia inmunosupresora para pacientes que no responden a ITI. El tratamiento incluye la administración de fármacos inmunosupresores tales como ciclofosfamida, prednisona, azatioprina y ciclosporina que seleccionan como diana de manera inespecífica el sistema inmunitario. Estos tratamientos pueden tener efectos secundarios asociados con la inmunosupresión general.

20 Existe un interés renovado en la reducción selectiva de células B usando Rituximab™, un anticuerpo monoclonal humanizado frente al antígeno CD20 de células B. Sin embargo, se han producido reacciones a la infusión, enfermedad del suero e infecciones oportunistas en algunos niños tratados con este fármaco (DiMichele (2007) J Thromb Haemost 5:143-50).

Hemofilia adquirida

30 La hemofilia adquirida es un raro estado autoinmunitario que afecta a entre 1 y 4 personas por millón. En este estado, los sujetos que no han nacido con hemofilia desarrollan anticuerpos contra uno de los factores de coagulación tales como el factor VIII. Se cree que el embarazo y enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y cáncer pueden aumentar el riesgo de desarrollar hemofilia adquirida. Aunque existen diferencias en los mecanismos inmunitarios subyacentes que conducen a su producción, las manifestaciones clínicas de los inhibidores de FVIII producidos en respuesta a la terapia de sustitución de factores de coagulación y los producidos en hemofilia adquirida son similares.

35 Los pacientes con hemofilia adquirida tienen una tasa de mortalidad que se aproxima al 25%, debido en parte a la asociación de inhibidores adquiridos con complicaciones de hemorragia graves. La terapia de inhibidores de autoanticuerpos adquiridos se basa principalmente en la necesidad de controlar o prevenir las complicaciones hemorrágicas agudas, que con frecuencia son potencialmente mortales y que ponen en peligro una extremidad y de manera secundaria erradicar el autoanticuerpo para restablecer la coagulación normal.

40 Algunas hemorragias asociadas con inhibidores de autoanticuerpo de bajo título (< 5 unidades Bethesda) pueden tratarse eficazmente con concentrados de FVIII administrados a altas dosis. El concentrado de FVIII porcino se consideró anteriormente como una terapia de primera línea crítica para la hemorragia relacionada con hemofilia adquirida puesto que era la única terapia de sustitución que proporcionaba una oportunidad para medir realmente los niveles de actividad de coagulación de FVIII tras la infusión en el laboratorio. Se retiró el producto del mercado en 2004 debido a contaminación de los bancos de plasma porcino por parvovirus porcino. En la actualidad, los agentes de "desvío" son los usados más comúnmente, pero existen posibles riesgos de trombogenicidad y sólo existe una eficacia de aproximadamente el 80% para cada producto. El intercambio de plasma mediante plasmaféresis e inmunoadsorción extracorpórea puede ser necesario para reducir temporalmente el título de inhibidor lo suficiente como para que los agentes de desvío o la sustitución de FVIII proporcionen una hemostasia adecuada.

45 La erradicación de los inhibidores de autoanticuerpo depende de medidas inmunosupresoras, tales como: (1) administración de corticosteroides con una eficacia del 30%-50% en 3-6 semanas; (2) el uso de agentes quimioterápicos citotóxicos y mielosupresores, por ejemplo, ciclofosfamida, ciclosporina, 2-clorodesoxiadenosina; (3) inmunomodulación con inmunoglobulina por vía intravenosa; y (4) reducción selectiva de linfocitos B con rituximab. Los pacientes que responden a Rituximab™ pueden requerir el uso concurrente de esteroides y las recaídas pueden responder al nuevo tratamiento.

50 Por tanto, todos los métodos disponibles actualmente para reducir la producción de aloanticuerpos asociada con el tratamiento de la hemofilia A, y la producción de autoanticuerpos en la hemofilia adquirida, tienen inconvenientes. Por tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para abordar el asunto de los anticuerpos anti-FVIII en hemofilia A y hemofilia adquirida.

Los presentes inventores han encontrado que es posible prevenir la formación de anticuerpos inhibidores contra FVIII mediante la inducción previa de tolerancia en el paciente con péptidos derivados de FVIII.

5 Sumario de aspectos de la invención

Por tanto, la presente invención se refiere a un péptido que puede derivarse de FVIII que puede inducir o restablecer la tolerancia a FVIII.

10 Los presentes inventores han identificado varias regiones inmunodominantes de FVIII que se predice que dan lugar a péptidos de unión a HLA-DR2 (tabla 1). De estos péptidos, se considera que las regiones 545-559 y 1788-1803 del factor VIII representan las regiones de epítomos de células T inmunodominantes en la respuesta de células T restringida a HLA-DR2 frente al factor VIII humano. Se ha mostrado que el tratamiento de ratones con estos péptidos conduce a una supresión sustancial de la respuesta inmunitaria frente al factor VIII.

15 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que consiste en una de las siguientes secuencias:

PRCLTRYSSFVNME

20 VEDNIMVTFRNQASR

DNIMVTFRNQASRPY

25 IMVTFRNQASRPYSF

MVTFRNQASRPYSFY

30 VTFRNQASRPYSFYS

TKSDPRCLTRYSSF

KSDPRCLTRYSSFV

35 SDPRCLTRYSSFVN

DPRCLTRYSSFVNMM

RCLTRYSSFVNMER

40 CLTRYSSFVNMERD

PPIIARYIRLHPHTHY

45 PIIARYIRLHPHTHYS

IARYIRLHPHTHYSIR

ARYIRLHPHTHYSIRS.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende un péptido del primer aspecto de la invención. La composición puede comprender una pluralidad de tales péptidos. En particular, la composición puede comprender los siguientes péptidos: PRCLTRYSSFVNME y DNIMVTFRNQASRPY.

55 La composición puede estar en forma de un kit, en el que la pluralidad de péptidos se proporcionan por separado para la administración separada, posterior, secuencial o simultánea.

60 El péptido o una composición de la invención puede ser para su uso en la supresión, la reducción o la prevención del desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el factor VIII.

El péptido o la composición puede ser para su uso en un método para tratar hemofilia en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de administración de un péptido o una composición de este tipo al sujeto.

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

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

5 Los inhibidores del factor VIII se encuentran más frecuentemente en individuos que expresan HLA-DR2. Por tanto el sujeto tratado mediante el método de la invención puede ser positivo para HLA-DR2.

Descripción de las figuras

10 Figura 1: Respuestas de memoria para células de ganglios linfáticos (CGL) de ratones FVIII+DR2+ a los que se les administró una dosis de refuerzo de rhFVIII/CFA

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

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

Figura 3: Respuestas de memoria para CGL de ratones FVIII-DR2+ a los que se les administró una dosis de refuerzo de rhFVIII/CFA

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

Figura 5: Clones FVIII-/- específicos para a) DNIMV y b) PRCLT

30 Figura 6: Respuestas de memoria para CGL frente a FVIII para ratones FVIII+DR2+ tratados 3 veces por vía i.p. con péptido antes de la administración de la dosis de refuerzo de rhFVIII/CFA.

35 Figura 7: Determinación de la gama de epítomos peptídicos que pueden funcionar como apítomos usando clones de hibridoma de células T FVIII-DR2+ específicos para péptidos solapantes derivados de FVIII. El péptido original se denomina 0. Un desplazamiento de un aminoácido hacia el extremo N-terminal es -1, desplazamientos de dos aminoácidos hacia el extremo N-terminal es -2 etc. Un desplazamiento hacia el extremo C-terminal es +1 etc.

Figura 8: Producción de IFN-gamma por células de ganglios linfáticos en respuesta a FVIII para ratones FVIII-DR2+ tratados con los péptidos derivados de FVIII PRCLT, DNIMV o una mezcla de ambos de estos dos.

40 Descripción detallada

Péptido

45 La presente invención se refiere a un péptido.

El término "péptido" se usa en el sentido normal para significar una serie de residuos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos peptídicos sintéticos.

50 El péptido de la presente invención puede prepararse usando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín.). Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos mediante técnicas de fase sólida (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), escindirlos de la resina y purificarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, Nueva York NY). Puede lograrse la síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

60 El péptido puede prepararse alternativamente mediante medios recombinantes o mediante escisión del factor VIII. La composición de un péptido puede confirmarse mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

Para fines prácticos, existen otras diversas características que el péptido puede mostrar. Por ejemplo, el péptido puede ser soluble a una concentración que permite su uso *in vivo*. El péptido puede ser soluble a concentraciones de hasta 0,5 mg/ml, 1 mg/ml o 5 mg/ml.

65 También es importante que el péptido sea lo suficientemente estable *in vivo* como para ser útil terapéuticamente. La

semivida del péptido *in vivo* puede ser de al menos 10 minutos, 30 minutos, 4 horas o 24 horas.

El péptido también puede demostrar buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido puede mantener una conformación *in vivo* que le permita unirse a una molécula de CMH en la superficie celular sin excesivo impedimento.

5

Epítomos

En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T pueden reconocer epítomos internos de un antígeno proteico. Las células presentadoras de antígeno (CPA) captan antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido puede unirse a una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o II en el interior de la célula y transportarse hasta la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular junto con una molécula de CMH, el péptido puede reconocerse por una célula T (mediante el receptor de células T (RCT)), en cuyo caso el péptido es un epítomo de células T.

10

15 Por tanto un epítomo es un péptido que puede derivarse de un antígeno que puede unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de CMH de clase I o II y reconocerse por una célula T.

El epítomo mínimo es el fragmento más corto que puede derivarse de un epítomo, que puede unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de CMH de clase I o II y reconocerse por una célula T. Para una región inmunogénica dada, normalmente es posible generar un "conjunto anidado" de péptidos solapantes que actúan como epítomos, que contienen todos ellos el epítomo mínimo pero difieren en sus regiones flanqueantes.

20

Del mismo modo, es posible identificar el epítomo mínimo para una combinación molécula de CMH:célula T particular midiendo la respuesta frente a péptidos truncados. Por ejemplo si se obtiene una respuesta frente al péptido que comprende los residuos 1-15 en la biblioteca solapante, pueden usarse conjuntos que están truncados en ambos extremos (es decir 1-14, 1-13, 1-12, etc. y 2-15, 3-15, 4-15, etc.) para identificar el epítomo mínimo.

25

Apítomos

30 Los presentes inventores han determinado previamente que existe un vínculo entre la capacidad de un péptido para unirse a una molécula de CMH de clase I o II y presentarse a una célula T sin procesamiento antigénico adicional, y la capacidad del péptido para inducir tolerancia *in vivo* (documento WO 02/16410). Si un péptido es demasiado largo para unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de CMH sin procesamiento adicional (por ejemplo corte), o se une en una conformación inapropiada, entonces no será tolerogénico *in vivo*. Si, por otro lado, el péptido es de un tamaño y una conformación adecuados para unirse directamente al surco de unión a péptidos de CMH y presentarse a una célula T, entonces puede predecirse que este péptido será útil para la inducción de tolerancia.

35

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

40

Los péptidos de la presente invención son apítomos (*apitopes*, *Antigen Processing-Independent epiTOPES*, epítomos independientes del procesamiento antigénico) porque pueden unirse a una molécula de CMH de clase II y estimular una respuesta a partir de células T específicas de factor VIII sin procesamiento antigénico adicional. Puede predecirse que tales apítomos provocan tolerancia a FVIII, siguiendo el método basado en normas descrito en el documento WO 02/16410.

45

Un péptido de la presente invención puede ser de cualquier longitud que pueda unirse a una molécula de CMH de clase I o II sin procesamiento adicional. Normalmente, el péptido de la presente invención puede unirse a CMH de clase II.

50

Los péptidos que se unen a moléculas de CMH de clase I son normalmente de 7 a 13, más habitualmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre átomos en la cadena principal del péptido y sitios invariantes en el surco de unión a péptidos de todas las moléculas de CMH de clase I. Existen sitios invariantes en ambos extremos del surco que se unen a los extremos amino y carboxilo-terminal del péptido. Se adaptan variaciones en la longitud del péptido mediante un retorcimiento en la estructura principal del péptido, a menudo en los residuos de prolina o glicina que permiten la flexibilidad requerida.

55

Los péptidos que se unen a moléculas de CMH de clase II son normalmente de entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más habitualmente de entre 10 y 17 aminoácidos de longitud, y pueden ser más largos (por ejemplo de hasta 40 aminoácidos). Estos péptidos se encuentran en una conformación extendida a lo largo del surco de unión a péptidos de CMH II que (a diferencia del surco de unión a péptidos de CMH de clase I) está abierto en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente mediante contactos de átomos de la cadena principal con residuos conservados que recubren el surco de unión a péptidos.

60

65 Secuencias peptídicas

El primer aspecto de la invención se refiere a un péptido que consiste en una de las siguientes secuencias:

PRCLTRYSSFVNME

5 VEDNIMVTFRNQASR

DNIMVTFRNQASRPY

IMVTFRNQASRPYSF

10 MVTFRNQASRPYSFY

VTFRNQASRPYSFYS

15 TKSDPRCLTRYSSF

KSDPRCLTRYSSFV

SDPRCLTRYSSFVN

20 DPRCLTRYSSFVNM

RCLTRYSSFVNMER

25 CLTRYSSFVNMERD

PPIIARYIRLHPHXY

PIIARYIRLHPHYS

30 IARYIRLHPHYSIR

ARYIRLHPHYSIRS

35 SPIPA

Se conocen diversos sistemas de presentación independientes del procesamiento antigénico (SPIPA), incluyendo:

a) CPA fijada (con o sin anticuerpos frente a CD28);

40 b) membranas lipídicas que contienen moléculas de CMH de clase I o II (con o sin anticuerpos frente a CD28); y

c) CHM purificado natural o recombinante en forma unida a placas (con o sin anticuerpos frente a CD28).

45 Todos estos sistemas pueden presentar antígeno junto con una molécula de CMH, pero no pueden procesar antígeno. En todos estos sistemas, la función de procesamiento está o bien ausente o bien deshabilitada. Esto hace posible investigar si un péptido puede unirse a una molécula de CMH de clase I o II y presentarse a una célula T sin procesamiento antigénico adicional.

50 El uso de CPA fijada para investigar respuestas de células T se conoce bien en la técnica, por ejemplo en estudios para investigar el epítipo mínimo dentro de un polipéptido, midiendo la respuesta frente a péptidos truncados (Fairchild *et al* (1996) *Int. Immunol.* 8:1035-1043). CPA puede fijarse usando, por ejemplo formaldehído (habitualmente paraformaldehído) o glutaraldehído.

55 Pueden prepararse membranas lipídicas (que pueden ser membranas planas o liposomas) usando lípidos artificiales o pueden ser fracciones de membrana plasmática/microsómicas de CPA.

60 En uso, el SPIPA puede aplicarse a los pocillos de una placa de cultivo tisular. Entonces se añaden antígenos peptídicos y se detecta la unión del péptido a la parte de CMH del SPIPA mediante la adición de clones o líneas de células T seleccionados. Puede medirse la activación del clon o la línea de células T mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante incorporación de ³H-timidina o secreción de citocinas.

Factor VIII

65 El péptido de la invención puede derivarse del factor VIII.

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

5 El gen del factor VIII produce dos transcritos sometidos a corte y empalme alternativamente. La variante de transcrito 1 codifica para una glicoproteína grande, la isoforma a, que circula en plasma y se asocia con el factor de von Willebrand en un complejo no covalente. Esta proteína experimenta múltiples acontecimientos de escisión. La variante de transcrito 2 codifica para una supuesta proteína pequeña, la isoforma b, que consiste principalmente en el dominio de unión a fosfolípidos del factor VIIIc. Este dominio de unión es esencial para la actividad coagulante.

10 Se elucidó la secuencia completa de 186.000 pares de bases del gen del factor VIII humano a mediados de los años 1980 (Gitschier *et al* (1984) Nature 312 326-330). Al mismo tiempo, se usaron clones de ADN que codifican para la secuencia completa de 2351 aminoácidos para producir factor VIII biológicamente activo en células de mamífero cultivadas (Wood *et al* (1984) Nature 312:330-337). La secuencia completa de 2.351 aminoácidos para el factor VIII humano se facilita en SEQ ID No. 1.

15 El péptido de la presente invención puede derivarse del factor VIII. El péptido puede consistir, por ejemplo, en una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia del factor VIII. El péptido puede obtenerse o se obtiene de la escisión de la secuencia del factor VIII.

20 Una forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácido en forma peptoide, se entenderá bien por los expertos en la técnica. Para que no haya ninguna duda, "la forma peptoide" se usa para referirse a residuos de aminoácido variantes en los que el grupo sustituyente en el carbono α está en el átomo de nitrógeno del residuo en vez de en el carbono α . Se conocen en la técnica procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide, por ejemplo Simon RJ *et al.*, PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

Tolerancia

30 Los epítomos de células T desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria adaptativa frente a cualquier antígeno, ya sea propio o foráneo. El papel fundamental desempeñado por los epítomos de células T en enfermedades por hipersensibilidad (que incluyen alergia, enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplantes) se ha demostrado a través del uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante la inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de los epítomos de células T) en combinación con adyuvante.

35 En cambio, se ha mostrado que es posible inducir tolerancia inmunológica hacia antígenos particulares mediante la administración de epítomos peptídicos en forma soluble. La administración de antígenos peptídicos solubles ha demostrado ser un medio eficaz de inhibición de la enfermedad en encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE – a model for multiple sclerosis (MS)) (Metzler y Wraith (1993) Int. Immunol. 5:1159-1165; Liu y Wraith (1995) Int. Immunol. 7:1255-1263; Anderton y Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes y uveorretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). Esto también se ha demostrado como medio de tratamiento de una enfermedad en curso en EAE (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente).

45 La tolerancia es la ausencia de respuesta frente a un antígeno. La tolerancia a antígenos propios es una característica esencial del sistema inmunitario, cuando esto se pierde, puede resultar una enfermedad autoinmunitaria. El sistema inmunitario adaptativo debe mantener la capacidad para responder a una enorme variedad de agentes infecciosos a la vez que evitar el ataque autoinmunitario de los antígenos propios contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto se controla en gran medida por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los antígenos propios se detectan en el timo, de modo que la muerte de timocitos autorreactivos sigue siendo incompleta. Por tanto, también existen mecanismos mediante los que puede adquirirse tolerancia por linfocitos T autorreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). Se facilita una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica en Anderton *et al* (1999) (Immunological Reviews 169:123-137).

55 En la hemofilia A, los pacientes tienen un defecto en el gen del factor VIII. Esto significa que el factor VIII no se reconoce como un antígeno "propio" por el sistema inmunitario. Por tanto cuando se administra factor VIII durante la terapia de sustitución de factores de coagulación, se genera una respuesta autoinmunitaria frente a la proteína foránea, que conduce a la producción de anticuerpos inhibidores contra FVIII.

60 Los péptidos de la presente invención pueden inducir tolerancia al factor VIII de manera que cuando se administra FVIII terapéuticamente, no induce una respuesta inmunitaria y no se desarrollan inhibidores de FVIII.

65 La hemofilia adquirida es una enfermedad autoinmunitaria en la que falla la tolerancia al factor VIII. En este caso, pueden administrarse péptidos de la presente invención para reinstaurar la tolerancia a esta proteína propia y reducir la respuesta inmunitaria patógena.

La tolerancia puede resultar de o caracterizarse por la inducción de anergia en al menos una parte de las células T CD4+. Para activar una célula T, un péptido debe asociarse con una CPA "profesional" que puede suministrar dos señales a las células T. La primera señal (señal 1) se suministra por el complejo CMH-péptido en la superficie celular de la CPA y se recibe por la célula T mediante el RCT. La segunda señal (señal 2) se suministra por moléculas coestimuladoras en la superficie de la CPA, tales como CD80 y CD86, y se recibe por CD28 en la superficie de la célula T. Se cree que cuando una célula T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no se activa y, de hecho, se vuelve anérgica. Las células T anérgicas no responden a una exposición antigénica posterior, y pueden llegar a suprimir otras respuestas inmunitarias. Se cree que las células T anérgicas están implicadas en la mediación de la tolerancia de células T.

Sin querer restringirse por la teoría, los presentes inventores predicen que los péptidos que requieren procesamiento antes de que puedan presentarse junto con moléculas de CMH no inducen tolerancia porque tienen que manejarse por células presentadoras de antígeno maduras. Las células presentadoras de antígeno maduras (tales como macrófagos, células B y células dendríticas) pueden producir procesamiento antigénico, pero también suministrar ambas señales 1 y 2 a una célula T, lo que conduce a la activación de células T. Los apítotos, por otro lado, podrán unirse a CMH de clase II en CPA inmaduras. Por tanto se presentarán a células T sin coestimulación, lo que conduce a tolerancia y anergia de células T.

Naturalmente, los apítotos también pueden unirse a moléculas de CMH en la superficie celular de CPA maduras. Sin embargo, el sistema inmunitario contiene una mayor abundancia de CPA inmaduras que maduras (se ha sugerido que menos del 10% de las células dendríticas se activan, Summers *et al.* (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). Por tanto la posición por defecto para un apítoto será de anergia/tolerancia, más que de activación.

La inducción de tolerancia a FVIII puede monitorizarse *in vivo* examinando una reducción en el nivel de:

(i) anticuerpos inhibidores contra FVIII:

(ii) células T CD4+ específicas para FVIII

(iii) células B que pueden secretar anticuerpos inhibidores contra FVIII

mediante técnicas conocidas en la técnica.

Se ha mostrado que, cuando se induce tolerancia mediante la administración de péptidos, se reduce la capacidad para proliferar de células T CD4+ específicas de antígeno. Además, la producción de IL-2, IFN- γ y la producción de IL-4 por estas células está regulada por disminución, pero la producción de IL-10 aumenta. Se ha mostrado que la neutralización de IL-10 en ratones en un estado de tolerancia inducida por péptidos restablece completamente la propensión a la enfermedad. Se ha propuesto que una población de células reguladoras persiste en el estado tolerante que produce IL-10 y media en la regulación inmunitaria (Burkhart *et al.* (1999) *Int. Immunol.* 11:1625-1634).

Por tanto la inducción de tolerancia también puede monitorizarse mediante diversas técnicas, incluyendo:

(a) la inducción de anergia en células T CD4+ (que puede detectarse mediante exposición posterior a FVIII *in vitro*);

(b) cambios en la población de células T CD4+, incluyendo:

(i) reducción en la proliferación;

(ii) regulación por disminución en la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4; y

(iii) aumento en la producción de IL-10.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tolerogénico" significa que puede inducir tolerancia.

Composición

La presente invención también se refiere a una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende un péptido según la invención.

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

Los péptidos de la composición pueden comprender cada uno un epítoto diferente.

La composición puede comprender los péptidos PRCLTRYSSFVNME y DNIMVTFRNQASRPY.

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

5 Cuando se administra para uso profiláctico, la composición puede reducir o prevenir la generación de una respuesta inmunitaria frente a FVIII. El nivel de respuesta inmunitaria es menor del que se habría obtenido en el paciente si no se hubiera tratado con la composición. El término "reducir" indica que se observa una reducción parcial en la respuesta inmunitaria, tal como una reducción del 50%, 70%, 80% o el 90% en la respuesta que se habría observado en el paciente si no se hubiera tratado con la composición (o en la respuesta observada en un paciente no tratado a lo largo del mismo periodo de tiempo). El término "prevenir" indica que no se observa una respuesta inmunitaria apreciable frente a FVIII.

10 Cuando se administra para uso terapéutico, la composición puede suprimir una respuesta inmunitaria frente a FVIII ya en curso. El término "suprimir" indica una reducción en el nivel de una respuesta inmunitaria en curso, en comparación con el nivel antes del tratamiento con el péptido, o el nivel que se habría observado en el mismo punto de tiempo si no se hubiera administrado el tratamiento.

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

20 (i) anticuerpos inhibidores contra FVIII:

(ii) células T CD4+ específicas para FVIII

25 (iii) células B que secretan anticuerpos inhibidores contra FVIII.

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

30 El tratamiento con la composición de la presente invención puede producir también o alternativamente anergia en células T CD4+ específicas para FVIII. La anergia puede detectarse, por ejemplo, mediante exposición posterior a FVIII *in vitro*.

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

40 Pueden detectarse los inhibidores de FVIII mediante la modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda de coagulación, en el que se somete a prueba la capacidad del plasma del paciente para inactivar FVIII en plasma normal. Una unidad Bethesda se define como la cantidad de anticuerpo que neutraliza el 50% de la actividad de FVIII en plasma, y títulos de 0,6 UB o superiores sugieren la presencia de anticuerpo.

Los inhibidores se clasifican generalmente como de bajo título si el nivel es <5 UB y de alto título si ≥ 5 UB.

45 El nivel de anticuerpos inhibidores contra FVIII circulantes puede reducirse hasta el 90%, 75%, 50%, 20%, 10%, 5% del nivel de anticuerpos que se habría observado si el paciente no hubiera recibido tratamiento.

El nivel de anticuerpos inhibidores contra FVIII circulantes puede reducirse hasta 5, 4, 3, 2, 1 ó 0,5 UB.

50 Los péptidos y la composición de la invención pueden aumentar la cantidad o proporción de FVIII administrado terapéuticamente que está disponible para ayudar en la coagulación en un paciente. Esto se debe a la reducción en los inhibidores de FVIII que pueden evitar eficazmente que una proporción de FVIII ejerza su función terapéutica. El péptido o la composición de la invención pueden aumentar la cantidad de FVIII disponible en, por ejemplo, el 10%, 25%, 50%, 75% o el 100%.

55 Por tanto los péptidos y la composición de la invención pueden reducir la cantidad de FVIII que es necesario administrar para ayudar en la coagulación en un paciente.

Formulación

60 La composición puede prepararse como un inyectable, o bien como una suspensión o bien como una disolución líquida; también puede prepararse una forma sólida adecuada para la disolución en, o suspensión en, un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o los péptidos encapsularse en liposomas. Los principios activos pueden mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol, o similar y combinaciones de los mismos.

65

Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y/o agentes tamponantes del pH. Las sales tamponantes incluyen fosfato, citrato, acetato. Puede usarse ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio para el ajuste del pH. Para la estabilización, pueden usarse disacáridos tales como sacarosa o trehalosa.

5 Si la composición comprende una pluralidad de péptidos, la razón relativa de los péptidos puede ser aproximadamente igual. Alternativamente, las razones relativas de cada péptido pueden alterarse, por ejemplo, para centrar la respuesta tolerogénica en un subconjunto particular de células T autorreactivas o si se encuentra que un péptido funciona mejor que los otros en tipos de HLA particulares.

10 Tras la formulación, la composición puede incorporarse en un recipiente estéril que luego se sella y se almacena a baja temperatura, por ejemplo 4°C, o puede secarse por congelación.

15 De manera conveniente, se prepara la composición como un polvo liofilizado (secado por congelación). La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo en forma estabilizada. Se conocen bien procedimientos de liofilización en la técnica, véase por ejemplo <http://www.deviceink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Se usan comúnmente agentes de carga antes del secado por congelación, tales como manitol, dextrano o glicina.

20 La composición puede administrarse de manera conveniente tal como por las vías oral, intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o con supositorio o mediante implantes (por ejemplo usando moléculas de liberación lenta).

La composición puede administrarse ventajosamente por las vías intranasal, subcutánea o intradérmica.

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

30 El sujeto puede estar sometiéndose o estar a punto de someterse a terapia de sustitución coagulante con FVIII.

El sujeto puede estar sometiéndose o estar a punto de someterse a terapia génica con el gen de FVIII.

35 El sujeto puede tener un haplotipo HLA que se asocia con una predisposición a desarrollar autoanticuerpos o autoanticuerpos anti-FVIII inhibidores. El sujeto puede expresar HLA-DR2. Se conocen en la técnica métodos para determinar el haplotipo HLA de un individuo.

Normalmente, un médico determinará la dosificación exacta que será la más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular.

40 En una realización preferida, puede seguirse un protocolo de "ajuste de la dosis", en el que se administra al paciente una pluralidad de dosis en concentraciones ascendentes. Se ha usado un enfoque de este tipo, por ejemplo, para péptidos de la fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia al veneno de abejas (Müller *et al* (1998) *J. Allergy Clin Immunol.* 101:747-754 y Akdis *et al* (1998) *J. Clin. Invest.* 102:98-106).

45 Kits

De manera conveniente, si la composición comprende una pluralidad de péptidos, pueden administrarse juntos, en forma de una composición mezclada o cóctel. Sin embargo, puede haber circunstancias en las que es preferible proporcionar los péptidos por separado en forma de un kit, para la administración simultánea, separada, secuencial o combinada.

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

55 La composición farmacéutica o el kit de la invención pueden usarse para tratar y/o prevenir una enfermedad.

En particular, la composición/el kit pueden usarse para tratar y/o prevenir hemofilia A o hemofilia adquirida.

60 Hemofilia A

La hemofilia A (hemofilia clásica) está provocada por la deficiencia del factor VIII.

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

La hemofilia se divide normalmente en tres clases: grave, moderada y leve, basándose en el nivel del factor de coagulación en la sangre. En la hemofilia grave, existe menos del 1 por ciento de factor de coagulación normal. El grado de gravedad tiende a ser constante de una generación a otra.

5 En contra de la creencia popular, cortes y heridas menores no representan habitualmente una amenaza para los pacientes hemofílicos. Más bien, el mayor peligro procede de hemorragia espontánea que puede producirse en articulaciones y músculos. Se es más propenso a que se produzca esto durante los años de crecimiento rápido, normalmente entre las edades de los 5 y los 15 años.

10 La hemorragia espontánea repetida en articulaciones puede producir artritis, y se debilitan los músculos adyacentes. La presión sobre los nervios producida por la acumulación de sangre puede dar como resultado dolor, entumecimiento e incapacidad temporal para mover la zona afectada.

15 La hemofilia A se diagnostica habitualmente con un análisis de sangre para determinar la eficacia de la coagulación y para investigar si los niveles de factores de coagulación son anómalos.

20 El desarrollo de factores de coagulación purificados en los años 1970, aislados de sangre de donantes, mejoró significativamente las perspectivas a largo plazo para los pacientes hemofílicos. Los pacientes con hemofilia de leve a moderada pueden usar el tratamiento con FVIII según las necesidades, mientras que los pacientes con hemofilia grave pueden requerir tratamiento regular, indefinido.

25 Previamente, a los pacientes se les administraban concentrados de factor VIII reunidos a partir de miles de donaciones de plasma. Esto conduce a problemas significativos de contaminación con patógenos virales, particularmente el virus de la inmunodeficiencia humana y los virus de la hepatitis. Las técnicas de purificación de anticuerpos monoclonales, inactivación por calor y tratamiento con detergentes virucidas han hecho que los concentrados derivados de plasma sean relativamente seguros.

30 La tecnología de ADN recombinante ha proporcionado ahora una serie de productos sintéticos, tales como Recombinate™ y Kogenate™. Kogenate se prepara usando células de riñón de hámster recién nacido que expresan el factor VIII humano. El factor resultante está altamente purificado, eliminando cualquier posibilidad de transmisión de virus desde el plasma.

35 El péptido o la composición de la presente invención pueden administrarse antes y/o durante la terapia de sustitución de factor VIII.

40 La hemofilia A es una diana de enfermedad ideal para la terapia génica puesto que i) está producida por mutaciones en un único gen identificado, ii) un ligero aumento en los niveles de factor de coagulación *in vivo* puede convertir una hemofilia grave en una enfermedad más leve, y iii) las terapias de sustitución actuales se consideran inferiores a lo óptimo. Además, existe un amplio intervalo de seguridad si existe una "superación" del nivel deseado de actividad de coagulación.

45 Desafortunadamente, hasta la fecha no se ha hecho realidad la promesa de la terapia génica como cura para la hemofilia, principalmente debido a dificultades para encontrar un sistema de administración de genes que sea lo suficientemente no inmunogénico para permitir la expresión a largo plazo del factor de coagulación.

Los péptidos de la presente invención también serán adecuados para inducir tolerancia en un sujeto antes de la terapia génica con factor VIII y/o manejar la formación de inhibidores de FVIII en un paciente tras la terapia génica.

50 Hemofilia adquirida

La hemofilia adquirida se caracteriza por la presencia de inhibidores de autoanticuerpo contra FVIII en individuos con coagulación normal previamente. Es un estado raro, con una incidencia estimada de 1-3 por población de 1 millón de personas al año. La tasa de mortalidad asociada con los inhibidores de autoanticuerpo adquiridos se aproxima al 25% frente al riesgo de muerte sustancialmente menor en aquéllos con aloanticuerpos.

60 En comparación con los pacientes con inhibidores de aloanticuerpo, la hemofilia adquirida se caracteriza por: (1) un patrón de hemorragia más grave; (2) mayor incidencia en la población anciana; (3) aparición junto con enfermedades autoinmunitarias subyacentes identificables, cánceres linfoproliferativos o por tumores sólidos, embarazo y uso de determinados antibióticos tales como penicilina y sulfonamidas en aproximadamente el 50% de los casos; y (4) actividad inhibidora *in vitro* que sigue un patrón farmacocinético de tipo II con neutralización incompleta de la actividad del factor de coagulación seleccionado como diana por el autoanticuerpo, dando como resultado normalmente niveles residuales de factor VIII que oscilan entre el 2%-18% en el plasma del paciente.

65 El péptido o la composición de la presente invención pueden administrarse a un paciente con hemofilia adquirida, o a un paciente que se cree que corre el riesgo de desarrollar hemofilia adquirida debido a, por ejemplo:

i) tratamiento inminente con, por ejemplo penicilina o una sulfonamida

ii) progresión de un tumor u otro cáncer

iii) embarazo inminente o en los primeros meses.

La invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto habitual en la técnica al llevar a cabo la invención y no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de péptidos de factor VIII con HLA-DR2

Se comparó una serie de péptidos de 15 meros de FDVIII usando tres algoritmos de unión a HLA-DR:

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

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

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

Se seleccionaron los péptidos que se predijo que se unían a HLA-DR2 mediante más de uno de los programas y se diseñaron secuencias flanqueantes para los residuos centrales predichos (tabla 1).

TABLA 1

N.º de péptido	Primeros AA de FVIII	Secuencia en código de un solo aminoácido	También denominado en el presente documento:
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIARYIRLHPHXY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYSSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFLPNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

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

Se inmunizaron ratones transgénicos para HLA-DR2 con factor VIII humano en adyuvante. Se recogieron células de ganglios linfáticos drenantes y se volvieron a estimular *in vitro* con diferentes concentraciones de los 12 péptidos de la tabla 1. Se muestran los resultados en la figura 1.

Las células restringidas por HLA-DR2 de ratones inmunizados con factor VIII responden claramente de forma intensa frente al péptido DNIMV (1^{er} aminoácido 1788). También existen respuestas frente a los péptidos PRCLT (545) y PPIIA (2161).

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

Se inmunizaron en primer lugar ratones HLA-DR2 con factor VIII en adyuvante. Se volvieron a estimular células de bazo de ratones inmunes *in vitro* con factor VIII y se fusionaron los linfoblastos resultantes con el timoma BW5147 usando polietilenglicol.

Se seleccionaron hibridomas de células T en medio HAT y se clonaron los hibridomas y se sometieron a prueba para determinar su respuesta frente al factor VIII. Entonces se examinaron los hibridomas para determinar su respuesta frente a los 12 péptidos predichos. De los 27 hibridomas examinados, 11 respondieron frente a DNIMV, 3 frente a PRCLT y 3 frente a PPIIA, aunque la respuesta frente a PPIIA fue más débil y menos específica. La respuesta de dos hibridomas específicos para DNIMV y PRCLT se muestra en la figura 2.

Ejemplo 4 - Investigación de la respuesta de células de ganglios linfáticos de ratones FVIII-DR2+ frente a péptidos

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

Se inmunizaron estos animales FVIII-DR2+ con factor VIII en adyuvante. Se aislaron los ganglios linfáticos drenantes y se sometieron a prueba para determinar su respuesta frente al panel de péptidos. Tal como se muestra en la figura 3, estas células respondieron bien frente a PRCLT y DNIMV. Hubo una respuesta débil frente a GTLMV y una respuesta significativa frente a RYLRI.

Ejemplo 5 - Investigación de la respuesta de células T de ratones HLA-DR2 frente a péptidos

Se inmunizaron ratones deficientes en factor VIII que expresaban HLA-DR2 con factor VIII en adyuvante. Se volvieron a estimular células de bazo de los ratones inmunizados *in vitro* con factor VIII y se fusionaron los linfoblastos resultantes con BW5147, tal como se describió anteriormente. Se examinaron los hibridomas de células T para determinar su respuesta frente a los 12 péptidos predichos. De nuevo aún, la mayoría de los hibridomas respondió frente a los péptidos DNIMV y PRCLT. De 19 hibridomas específicos para el factor VIII, 10 respondieron frente a DNIMV, 6 frente a PRCLT, 1 frente a PPIIA, 1 frente a SLYIS y 1 frente a DTLLI. Se muestran ejemplos de respuestas por estos hibridomas en la figura 4.

Basándose en estos experimentos, queda claro que dos péptidos DNIMV (primer número de aminoácido 1788) y PRCLT (primer aminoácido 545) constituyen los epítomos inmunodominantes de células T en la respuesta de células T restringidas por HLA-DR2 frente al factor VIII humano.

Ejemplo 6 - DNIMV y PRCLT se comportan como apítomos

Para ser un apítomo, un péptido debe poder unirse a una molécula de CMH de clase I o II sin procesamiento antigénico adicional (es decir, corte) y presentarse a una célula T. En el presente caso, se investigó la capacidad de los péptidos para presentarse por CPA fijada.

Las células Mgar o bien eran frescas o bien se fijaron con paraformaldehído al 1%. Se sometieron a prueba clones para determinar la especificidad antigénica cultivando 100 µl de células de hibridoma con 5x10⁴ células Mgar en presencia y ausencia de epítomos peptídicos o rhFVIII 20 µg/ml durante la noche. Entonces se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para determinar la producción de IL-2 mediante ELISA. El hecho de que rhFVIII debe presentarse por células Mgar vivas demuestra que la proteína intacta requiere procesamiento antigénico para presentarse. Los péptidos DNIMV y PRCLT, por otro lado, se presentan por células Mgar tanto vivas como fijadas, indicando que estos péptidos funcionan como apítomos (figura 5).

Ejemplo 7 - Determinación de la gama de epítomos peptídicos que pueden funcionar como apítomos

Se identificó la gama de epítomos peptídicos que pueden funcionar como apítomos en las secuencias que rodean a DNIMV, PRCLT y los demás péptidos preparando paneles de péptidos solapantes (mostrados en las páginas 36-37) y examinando éstos usando los hibridomas de células T, usando el mismo método que en el ejemplo 5 (figura 7).

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

Se trataron ratones transgénicos HLA-DR2 con cualquiera de los dos péptidos solubles, o PBS como control, antes de la inmunización con factor VIII en adyuvante. Se aislaron los ganglios linfáticos drenantes y se volvieron a estimular las células *in vitro* con proteína de factor VIII para evaluar el estado inmunitario de los ratones. Tal como se muestra en la figura 6, el tratamiento de los ratones con o bien DNIMV o bien PRCLT condujo a una supresión sustancial de la respuesta inmunitaria frente al factor VIII.

Ejemplo 9 - Investigación de si DNIMV y PRCLT pueden inducir tolerancia en el ratón deficiente en factor VIII

Se sabe a partir del ejemplo 8 que estos dos péptidos pueden prevenir la respuesta inmunitaria frente al factor VIII en ratones que expresan factor VIII endógeno. Se repitió el experimento con animales FVIII-DR2+ para determinar si estos péptidos también previenen la respuesta inmunitaria frente al factor VIII en ratones deficientes en factor VIII.

Ejemplo 10 - Investigación de si DNIMV y PRCLT en combinación pueden inducir tolerancia en el ratón deficiente en factor VIII

Se combinaron los dos péptidos que se mostró que reducían individualmente la respuesta inmunitaria frente al factor VIII en ratones deficientes en factor VIII en el ejemplo 9. Tal como se muestra en la figura 8, el tratamiento de ratones tanto con DNIMV como con PRCLT condujo a una supresión sustancial de la respuesta inmunitaria frente al factor VIII, tal como se muestra mediante la disminución en la producción de IFN-gamma. IFN-gamma es la principal linfocina de cambio de clase requerida para neutralizar anticuerpos en el ratón. El efecto demostrado fue mayor que el observado usando cualquier péptido solo.

MÉTODOS

(i) Respuestas de memoria para ratones DR2+ a los que se les administró una dosis de refuerzo de rhFVIII

Se inmunizaron ratones carentes de CMH de clase II murino HLA-DR2+ con 40 µg de rhFVIII emulsionado en adyuvante completo de Freund complementado con 400 µg de *M. tuberculosis H37Ra* inactivado por calor, por vía subcutánea en la base de la cola. 10 días después se sacrificaron los ratones y se extirparon los ganglios linfáticos drenantes. Se prepararon suspensiones de células individuales y se incubaron los linfocitos a 4-5x10⁵ células por pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos durante 72 horas con las concentraciones indicadas de péptido o antígenos control antes de pulsarse con 0,5 µCi/pocillo de timidina tritiada durante 16 horas adicionales. Entonces se congelaron las placas antes de que se recogieran las células sobre esteras de filtro de vidrio y se midió la incorporación radiactiva usando un contador β de centelleo líquido.

(ii) Especificidad para péptidos de FVIII de hibridomas de células T generados a partir de ratones DR2+

Se inmunizaron ratones carentes de CMH de clase II murino HLA-DR2+ como anteriormente. El día 10, se extirparon los ganglios linfáticos drenantes y se cultivaron linfocitos a 2,5x10⁶ células/ml, 1 ml/pocillo en placas de 24 pocillos en presencia de rhFVIII 20 µg/ml durante 3 días. Tras esta estimulación, se recuperaron los linfocitos, se lavaron y se fusionaron con células de pareja de fusión de BW TCRαβ⁻ a una razón de 4 células BW con respecto a 1 linfocito, usando polietilenglicol tal como describieron Nelson *et al* (1980) PNAS 77 (5):2866. Se lavaron cuidadosamente las células fusionadas y luego se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano durante 2 días antes de la adición de medio HAT para seleccionar hibridomas de células T. Se monitorizaron las células para determinar su crecimiento y aproximadamente 10 días después de que se realizaran las fusiones, se seleccionaron clones individuales y se transfirieron a placas de 24 pocillos en medio HAT. Se mantuvieron los clones en medio HAT durante al menos 2 semanas antes de liberarse a medio HT y luego medio completo. Se sometieron a prueba los clones para determinar la especificidad antigénica cultivando 100 µl de células de hibridoma con 5x10⁴ células Mgar en presencia y ausencia de rhFVIII 20 µg/ml durante la noche. Se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para determinar la producción de IL-2 mediante ELISA, considerándose positivos para la especificidad para FVIII los clones que producían IL-2 en respuesta a rhFVIII. Para investigar el repertorio de péptidos de FVIII predichos, se sometieron a prueba de nuevo clones específicos de FVIII para determinar la producción de IL-2, tras incubación durante la noche con 20 µg/ml de cada uno de los 12 péptidos.

(iii) Respuestas de memoria para ratones FVIII-/- a los que se les administró una dosis de refuerzo de rhFVIII

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

(iv) Especificidad para péptidos de FVIII de hibridomas de células T generados a partir de ratones FVIII-/-

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

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

Se trataron ratones carentes de CMH de clase II murino HLA-DR2+ 3 veces con 100 µg de DNIMV, PRCLT o PPIIA disueltos en PBS, o el volumen equivalente de PBS solo. Se administraron los péptidos por vía intraperitoneal, con 3-4 días entre cada dosis. Tras la administración final, se les administró a los ratones una dosis de refuerzo de rhFVIII emulsionado en adyuvante completo de Freund como para (i). 10 días después, se extirparon los ganglios linfáticos drenantes y se cultivaron posteriormente linfocitos *in vitro* con rhFVIII, o cada uno de los péptidos de inducción de tolerancia así como antígenos control, durante 72 horas antes de la adición de timidina tritiada como para (i).

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

Se trataron ratones carentes de CMH de clase II murino HLA-DR2+ 3 veces con DNIMV, PRCLT o una combinación tanto de DNIMV como de PRCLT disueltos en PBS, o el volumen equivalente de PBS solo. Se administraron los

péptidos por vía intraperitoneal, a lo largo de 8 días. Tras la administración final, se les administró a los ratones una dosis de refuerzo de rhFVIII emulsionado en adyuvante completo de Freund como para (i). 10 días después se extirparon los ganglios linfáticos drenantes y se volvieron a estimular posteriormente linfocitos *in vitro* con rhFVIII. Entonces se recogieron los sobrenadantes y se midió IFN-gamma.

5 Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan al presente documento como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y el sistema de la invención descritos resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención. Aunque se ha descrito la invención en relación con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. En efecto, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en estudios celulares usando citometría de flujo o campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

SEQ ID No.1

1 mqieltstcfff lcllrffcsa trryylgave lswdymqsdll gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvykktlf veftdhlfnl akprppwmgll lgptiqaevy dtvvtlknm ashpvsilhav
 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpq gshyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
 181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lhkfillfav fdegkshwse tknslmqdrd
 241 aasarawpkm htvngyvnrsl pgligchrk svywhvigmg tpevhsifl eghtflvrnh
 301 rqaaleispi tfltaqtlm dlqqlfllch isshqhdgme ayvkvdsce epqlrmknne
 361 eaedydddlf dsemdvvrfd ddnspsfiqi rsvakkhpkt wwhyiaaeed dwdyaplvla
 421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdefktrea iqhesgilgp llygevgdtl
 481 liifknqasr pyniypghit dvrplysrll pkgvkhkdf pilpgeifky kwtvtvedgp
 541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvlfsvfde
 601 nrsywylteni qrlpnpagv qlfedefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
 661 igaqtdflsv ffsqytkhk mvyedtlfl pfsgetvfms menpglwlgl chnsdfrng
 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknaieprs fsqnsrhpst rqqfnatti
 781 pendiektqp wfahrtmpk iqnvssdill mlrlqsptph glslsdqea kyetfsddps
 841 pgaidsnsl semthfrpql hhsqdmvftp esglqirne klgtaatel kklfdkvsst
 901 snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmpv hydsqldtll fgkksplte sggplisee
 961 nndskllesg lmsqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatalrl
 1081 nhmsnktss knmemvqqkk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
 1141 qgppskqlvs lgpeksvegq nflseknkv vkggeftkdv glkemvfpss nrlflnldn
 1201 lhenhthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknflsl trqnvegsyd
 1261 gayapvlqdf rslndstnr kkhtahfskk geeenlegl nqtkqiveky acttrispnt
 1321 sqqnfvqrs kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
 1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrslpia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshpaasy
 1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailtle mtgdqrevgs lqtsatnsvt ykkventvlp
 1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldlv egslqgteg aikwneanrp
 1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
 1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnpv vlkrhqreit rttlqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkkrhyfia averlwdygm sssphvlrnr
 1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtrfnqasr
 1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkone tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhsgl igpllvchn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmernra
 1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsihfsg
 1981 vftvrkkey kmalylnypg vftvemlps kagiwrvecl igeihagms tflvysnkc
 2041 qtlpimasgh irdfqitasp qyqwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdlapmii
 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
 2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvtqgvksl ltsmyvkefl
 2281 isssqdghqw tiffqngkvk vfqgnqdsft pvvnslppl ltrylrihpq swvhqialrm
 2341 evlgceaql y

Paneles de péptidos solapantes preparados en el ejemplo 7

Conjunto solapante para DTLLIIFKNQASRPY

1. 473-488 YGEVGD~~TLLIIFKNQ~~
2. 474-489 GEVGD~~TLLIIFKNQA~~
3. 475-490 EVGD~~TLLIIFKNQAS~~
4. 476-491 VGD~~TLLIIFKNQASR~~
5. 477-492 GD~~TLLIIFKNQASRP~~
6. 478-493 D~~TLLIIFKNQASRPY~~
7. 479-494 T~~LIIIFKNQASRPYN~~
8. 480-495 L~~LIIFKNQASRPYNI~~
9. 481-496 LI~~IIFKNQASRPYNIY~~
10. 482-497 I~~IFKNQASRPYNIYP~~
11. 483-498 IF~~KNQASRPYNIYPH~~

5 Conjunto solapante para PRCLTRYSSFVNME

1. 540-554 PTKSD~~PRCLTRYSS~~
2. 541-555 TKSD~~PRCLTRYSSF~~
3. 542-556 KSD~~PRCLTRYSSFV~~
4. 543-557 SD~~PRCLTRYSSFVN~~
5. 544-558 D~~PRCLTRYSSFVNM~~
6. 545-559 P~~RCLTRYSSFVNME~~
7. 546-560 R~~CLTRYSSFVNMER~~
8. 547-561 C~~LTRYSSFVNMERD~~
9. 548-562 L~~TRYSSFVNMERDL~~
10. 549-563 T~~RYSSFVNMERDLA~~
11. 550-564 R~~YSSFVNMERDLAS~~

Conjunto solapante para DNIMVTFRNQASRPY

10

1. 1783-1797 RAEVED~~NIMVTFRNQ~~
2. 1784-1798 AEVED~~NIMVTFRNQA~~
3. 1785-1799 EVED~~NIMVTFRNQAS~~
4. 1786-1800 VED~~NIMVTFRNQASR~~
5. 1787-1801 ED~~NIMVTFRNQASRP~~
6. 1788-1802 DN~~IMVTFRNQASRPY~~
7. 1789-1803 NI~~MVTFRNQASRPYS~~
8. 1790-1804 IM~~VTFRNQASRPYSF~~
9. 1791-1805 MV~~TFRNQASRPYSFY~~
10. 1792-1806 VT~~FRNQASRPYSFYSS~~
11. 1793-1807 T~~FRNQASRPYSFYSS~~

Conjunto solapante para SLYISQFIIMYSLDG

15

1. 2109-2123 RQKFSS~~LYISQFIIM~~
2. 2110-2124 QKFSS~~LYISQFIIMY~~
3. 2111-2125 KFSS~~LYISQFIIMYS~~

4. 2112-2126	FSSLYISQFIIMYSL
5. 2113-2127	SSLYISQFIIMYSLD
6. 2114-2128	SLYISQFIIMYSLDG
7. 2115-2129	LYISQFIIMYSLDGK
8. 2116-2130	YISQFIIMYSLDGKK
9. 2117-2131	ISQFIIMYSLDGKKW
10. 2118-2132	SQFIIMYSLDGKKWQ
11. 2119-2133	QFIIMYSLDGKKWQT

Conjunto solapante para PPIARYIRLHPHY

1. 2156-2170	HNIFNPPPIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPPIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPPIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIARYIRLHPT
5. 2160-2174	NPPPIARYIRLHPHY
6. 2161-2175	PIARYIRLHPHY
7. 2162-2176	PIARYIRLHPHY
8. 2163-2177	IIARYIRLHPHY
9. 2164-2178	IARYIRLHPHY
10. 2165-2179	ARYIRLHPHY
5 11. 2166-2180	RYIRLHPHY

Conjunto solapante para RYLRIHPQSWVHQIA

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

Lista de secuencias

<110>	Apitope Technology (Bristol) Limited
<120>	PÉPTIDOS
15 <130>	P031150WO
<150>	GB 0723712.6
<151>	04-12-2007
<160>	96
<170>	PatentIn versión 3.5
20 <210>	1
<211>	2351
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	1

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

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

ES 2 458 315 T3

Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1910 1915 1920
 Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 1925 1930 1935
 Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
 1940 1945 1950
 Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1955 1960 1965
 Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
 1970 1975 1980
 Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
 1985 1990 1995
 Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
 2000 2005 2010
 Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
 2015 2020 2025
 Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
 2030 2035 2040
 Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 2045 2050 2055
 Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
 2060 2065 2070
 Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
 2075 2080 2085
 Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
 2090 2095 2100
 Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 2105 2110 2115
 Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 2120 2125 2130
 Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 2135 2140 2145

ES 2 458 315 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2345 2350

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met

1

5

10 <210> 3

<211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5 <400> 3
Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 4
Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1 5
 15 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintético
 <400> 5
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 6
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
 30 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 7
Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 45 <400> 8
Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
 1 5
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 9
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu
 55 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 10
Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 1 5 10 15
 5 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido sintético
 <400> 11
Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 12
Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 13
Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 1 5 10 15
 <210> 14
 30 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 35 <400> 14
Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 15
Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 45 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Péptido sintético
 <400> 16
Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 15
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 458 315 T3

<223> Péptido sintético
 <400> 17
 Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
 1 5 10 15
 <210> 18
 5 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10 <400> 18
 Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 19
 Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 20 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido sintético
 <400> 20
 Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 21
 Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys
 1 5 10 15
 35 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 22
 Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
 1 5 10 15
 45 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 50 <400> 23
 Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 24
Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 25
Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr
 10 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 26
Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 20 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25 <400> 27
Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 28
Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
 35 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 29
Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His
 45 1 5 10 15
 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 30
Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr
 50 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 31

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1 5 10 15
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 32
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr
 1 5 10 15
 10 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido sintético
 <400> 33
 Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 34
 Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn
 25 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 35
 Gly Asp Thr Leu Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 35 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 36
 Val Gly Asp Thr Leu Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 40 <210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 37
 Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15
 50 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Péptido sintético
 <400> 38
 Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial -
 5 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 39
Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn
1 5 10 15
 <210> 40
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 40
Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met
1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 41
Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
1 5 10 15
 25 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 42
Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp
1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 43
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu
1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 44
Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5 10 15
 <210> 45
 50 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 45
Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
1 5 10 15
 <210> 46

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Péptido sintético
 <400> 46
Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15
 <210> 47
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 47
Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 48
Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe
1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 49
Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr
1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 50
Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
1 5 10 15
 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Péptido sintético
 <400> 51
Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu
1 5 10 15
 <210> 52
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 52
Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5 <400> 53
 Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln
 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 54
 Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
 1 5 10 15
 15 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintético
 <400> 55
 Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 56
 Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
 30 1 5 10 15
 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 57
 Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp
 1 5 10 15
 <210> 58
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 45 <400> 58
 Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
 1 5 10 15
 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 59
 Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
 1 5 10 15
 55 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 60
Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
1 5 10 15
 5 <210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido sintético
 <400> 61
Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln
1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 62
Gly Thr Leu Met Val
1 5
 20 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 63
Thr Gln Thr Leu His
1 5
 30 <210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 64
Ser Leu Tyr Ile Ser
1 5
 <210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 65
Pro Pro Ile Ile Ala
1 5
 45 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Péptido sintético
 <400> 66
Pro Pro Leu Leu Thr
1 5
 <210> 67
 <211> 5
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 67
Met His Thr Val Asn
 1 5
 <210> 68
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 68
Leu Gly Gln Phe Leu
 10 1 5
 <210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 69
Asp Thr Leu Leu Ile
 1 5
 <210> 70
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25 <400> 70
Pro Arg Cys Leu Thr
 1 5
 <210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 71
Thr Glu Asn Ile Gln
 1 5
 35 <210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 72
Asp Asn Ile Met Val
 1 5
 <210> 73
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 73
Arg Tyr Leu Arg Ile
 50 1 5
 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 74

Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln
 1 5 10 15
 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 75
 Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala
 1 5 10 15
 10 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido sintético
 <400> 76
 Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15
 20 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 77
 Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 25 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 78
 Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 35 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 40 <400> 79
 Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 1 5 10 15
 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 80
 Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His
 1 5 10 15
 50 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Péptido sintético
 <400> 81

Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
 1 5 10 15
 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 82
 Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe
 1 5 10 15
 10 <210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido sintético
 <400> 83
 Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 1 5 10 15
 <210> 84
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 84
 Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 25 <210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 85
 Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln
 1 5 10 15
 35 <210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 86
 Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala
 1 5 10 15
 <210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 87
 Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 1 5 10 15
 50 <210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Péptido sintético
 <400> 88
 Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 89
Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys
1 5 10 15
 <210> 90
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 90
His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
1 5 10 15
 <210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 91
Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His
1 5 10 15
 <210> 92
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido sintético
 <400> 92
Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 93
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 93
Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr
1 5 10 15
 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Péptido sintético
 <400> 94
Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met
1 5 10 15
 <210> 95
 50 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 95
Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu
1 5 10 15
 <210> 96
 <211> 15

ES 2 458 315 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido sintético
<400> 96

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

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en una de las siguientes secuencias:

- 5 PRCLTRYSSFVNME
VEDNIMVTFRNQASR
DNIMVTFRNQASRPY
10 IMVTFRNQASRPYSF
MVTFRNQASRPYSFY
15 VTFRNQASRPYSFYS
TKSDPRCLTRYSSF
KSDPRCLTRYSSFV
20 SDPRCLTRYSSFVN
DPRCLTRYSSFVNM
25 RCLTRYSSFVNMER
CLTRYSSFVNMERD
PPIIARYIRLHPHTY
30 PIIARYIRLHPHTYS
IARYIRLHPHTYSIR
35 ARYIRLHPHTYSIRS.

2. Composición que comprende una pluralidad de péptidos según la reivindicación 1.

40 3. Péptido según la reivindicación 1, o composición según la reivindicación 2, para su uso en la supresión o prevención de la producción de anticuerpos inhibidores contra el factor VIII *in vivo*.

45 4. Péptido según la reivindicación 1, o composición según la reivindicación 2, para su uso en un método para tratar hemofilia en un sujeto que comprende la etapa de administrar un péptido según la reivindicación 1, o una composición según la reivindicación 2, al sujeto.

5. Péptido o composición según la reivindicación 4, en el que el sujeto tiene hemofilia A, y está sometiéndose, o está a punto de someterse, a terapia de sustitución de factor VIII.

50 6. Péptido o composición según la reivindicación 4, en el que el sujeto tiene, o corre el riesgo de contraer, hemofilia adquirida.

7. Péptido o composición según la reivindicación 4, en el que el sujeto es HLA-DR2.

FIG. 1

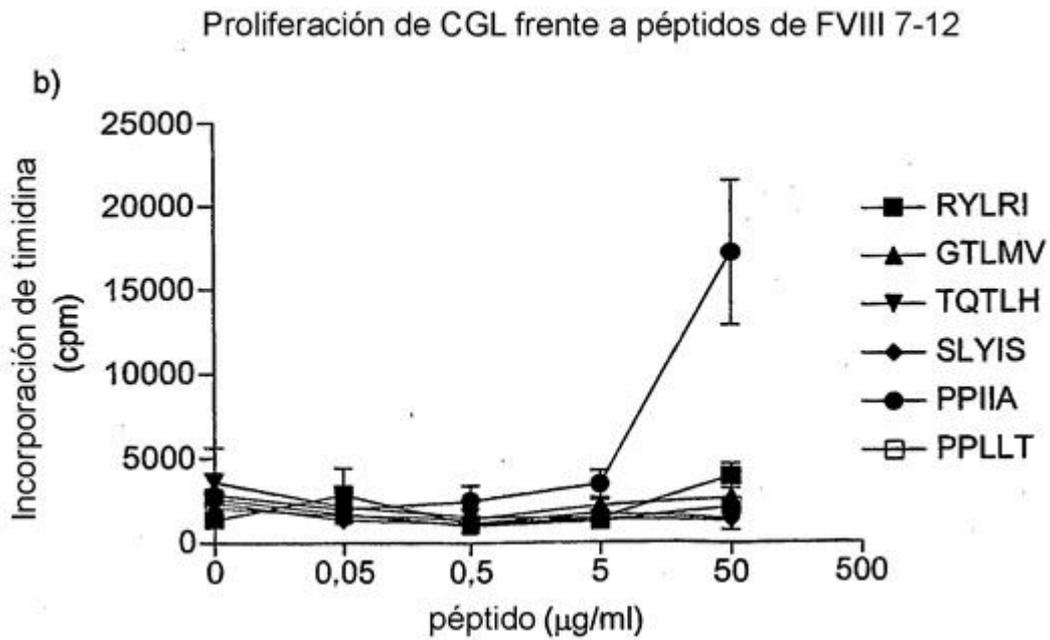
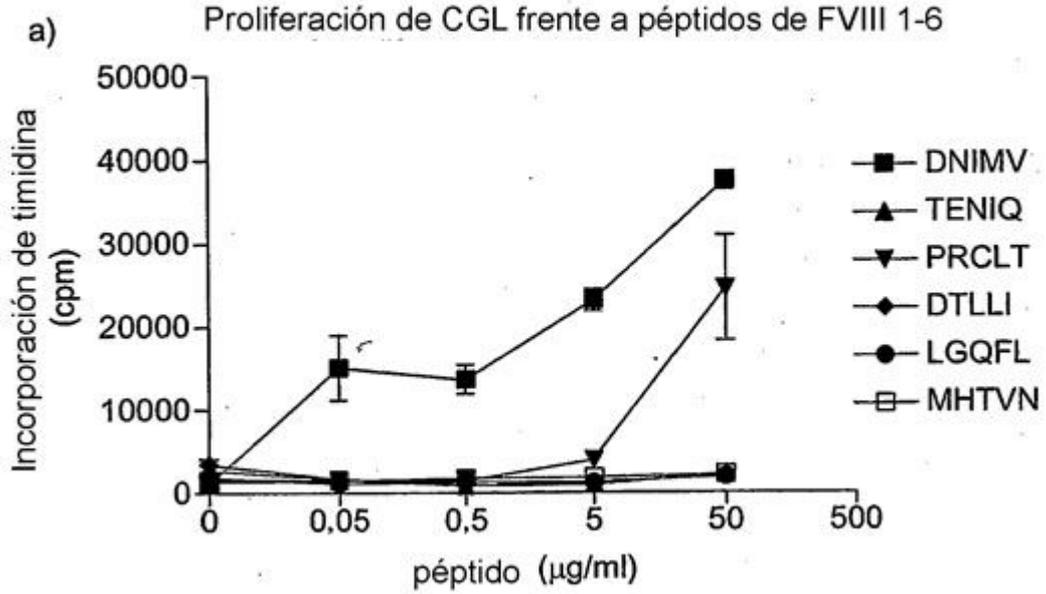


FIG. 1 CONT.

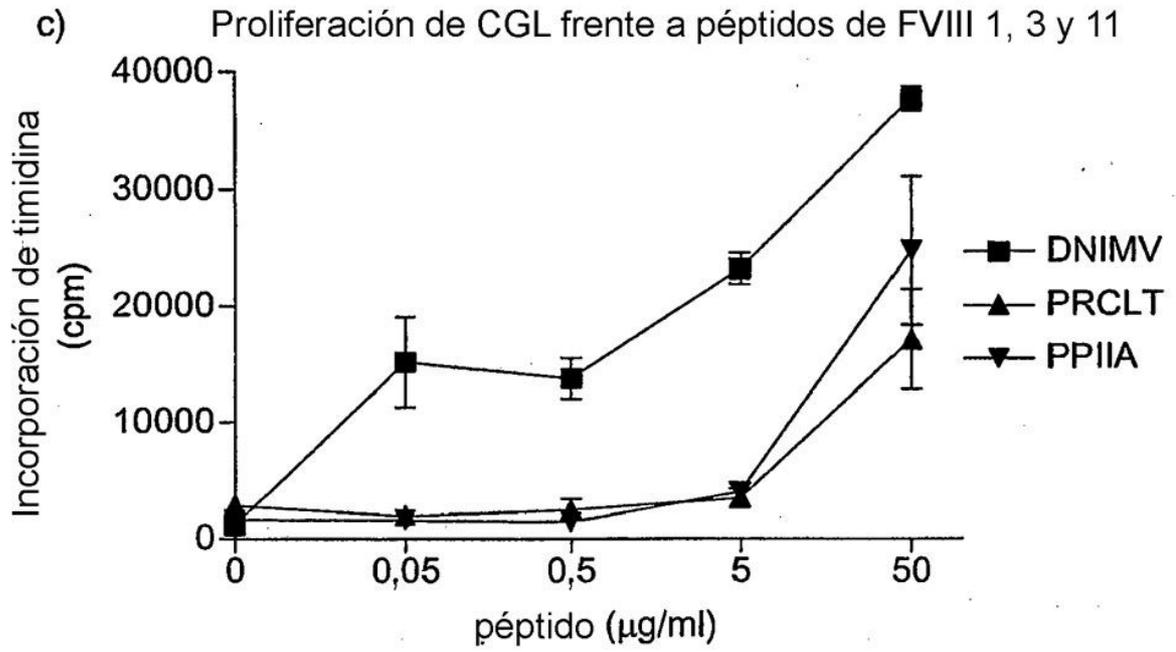


FIG. 2

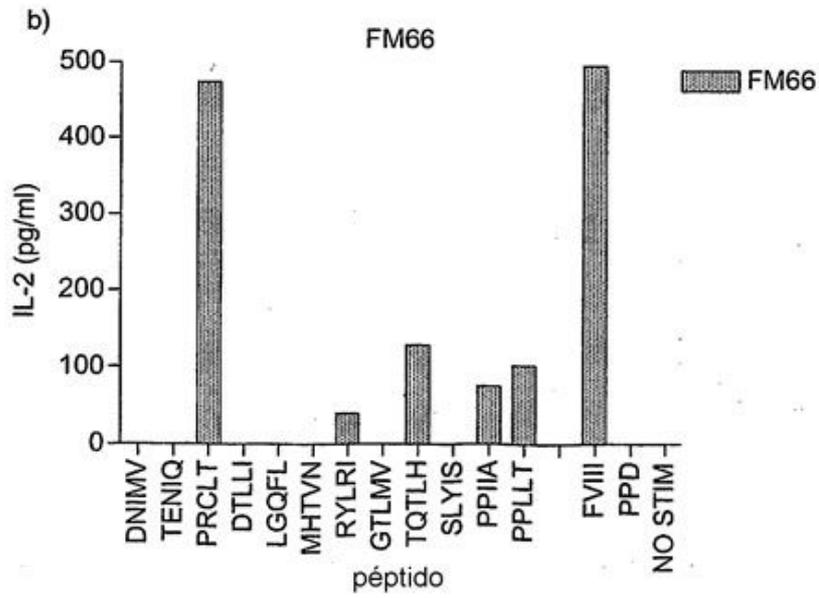
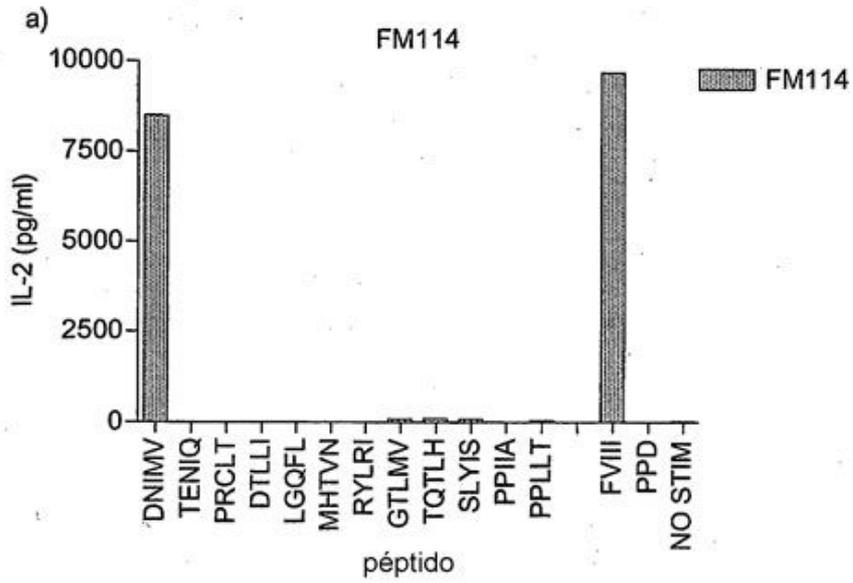


FIG. 3

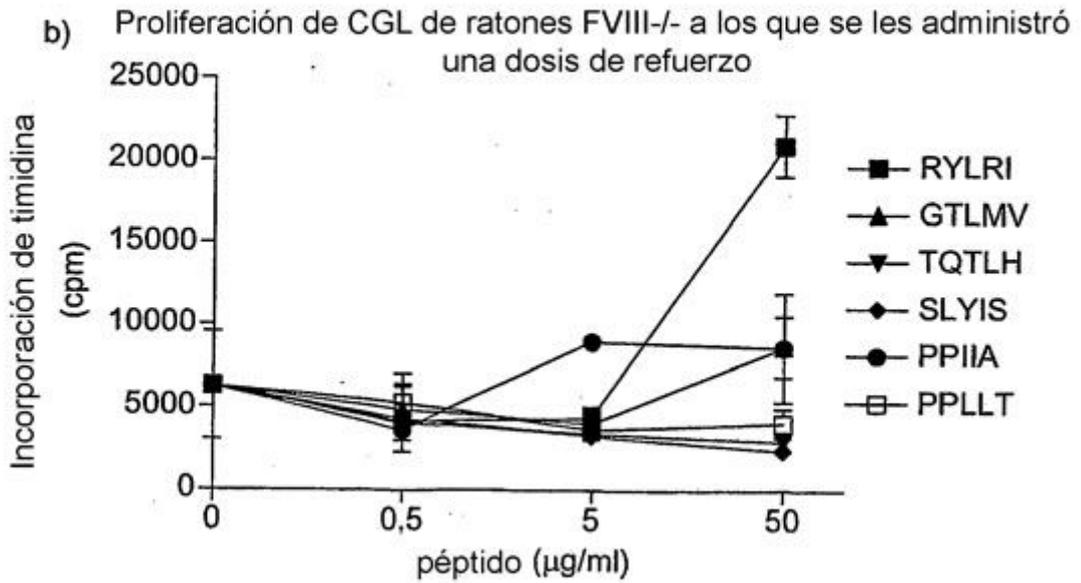
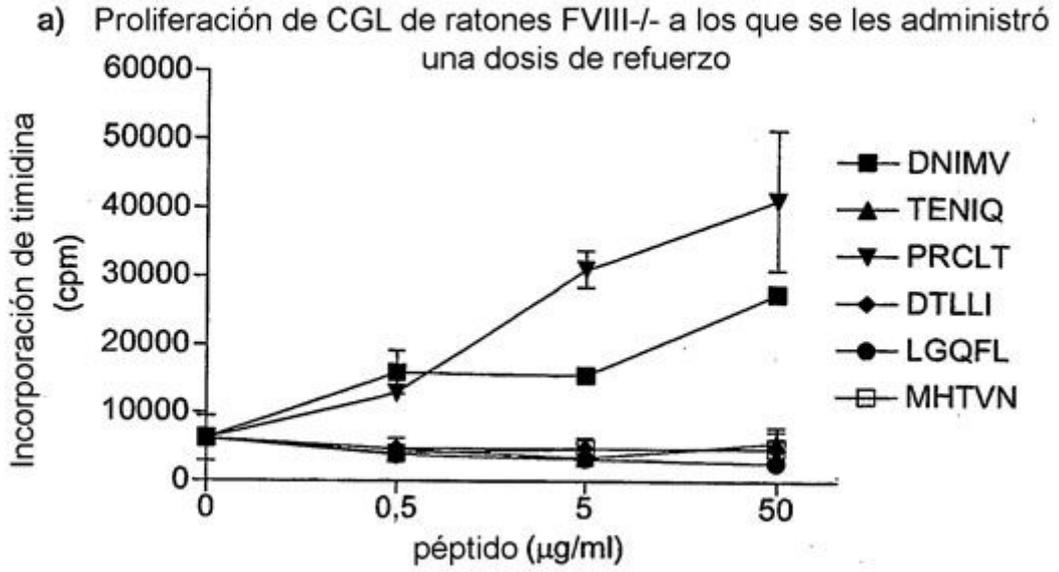


FIG. 3 CONT.

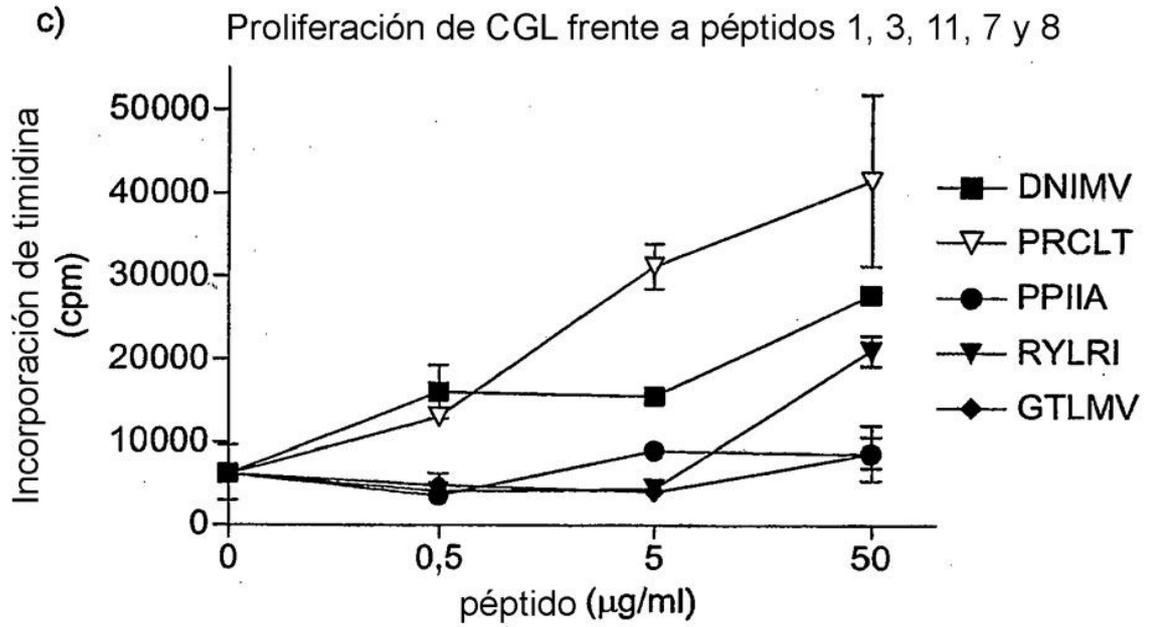


FIG. 4

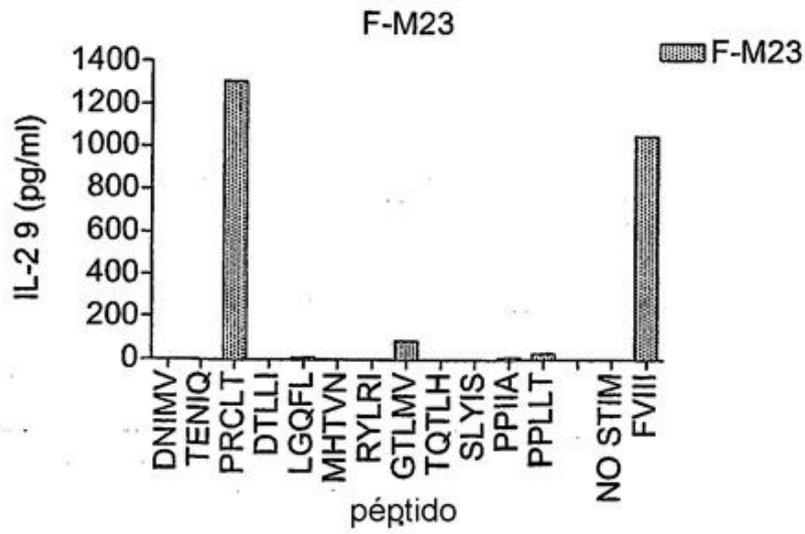
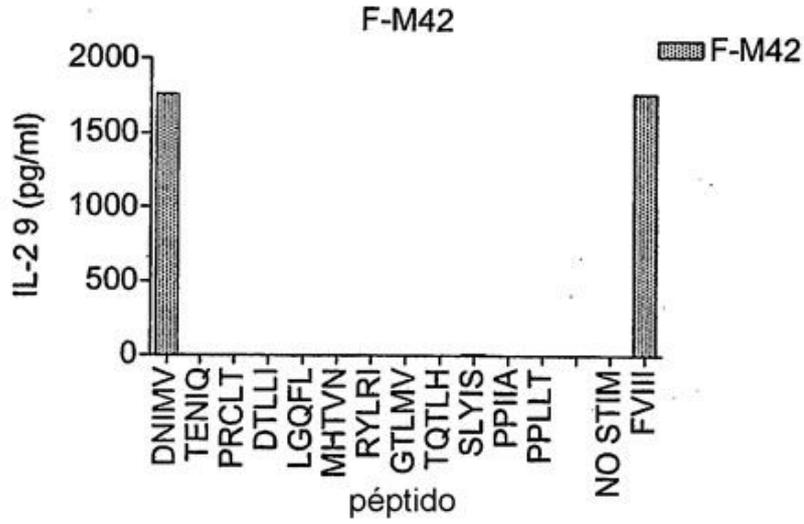


FIG. 4 CONT.

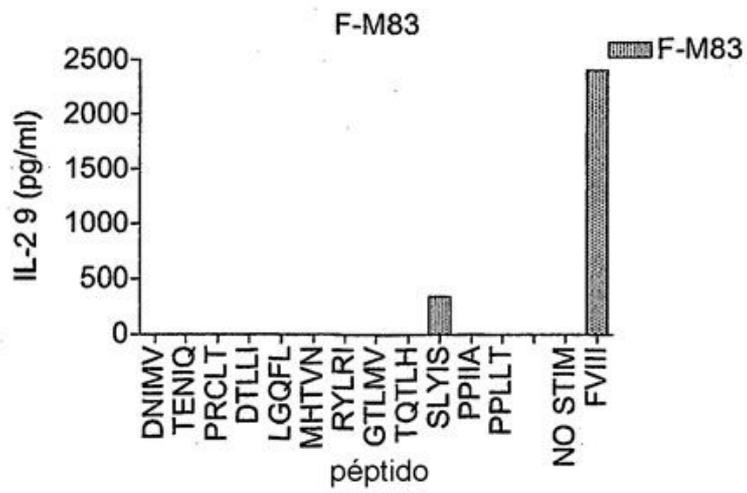
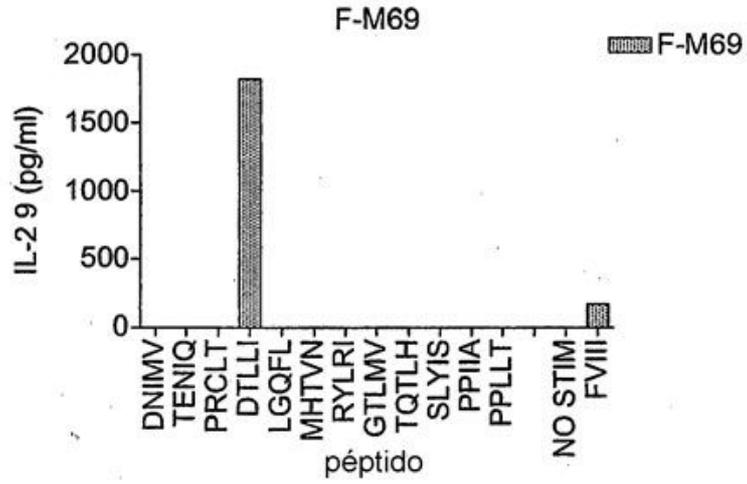


FIG. 5

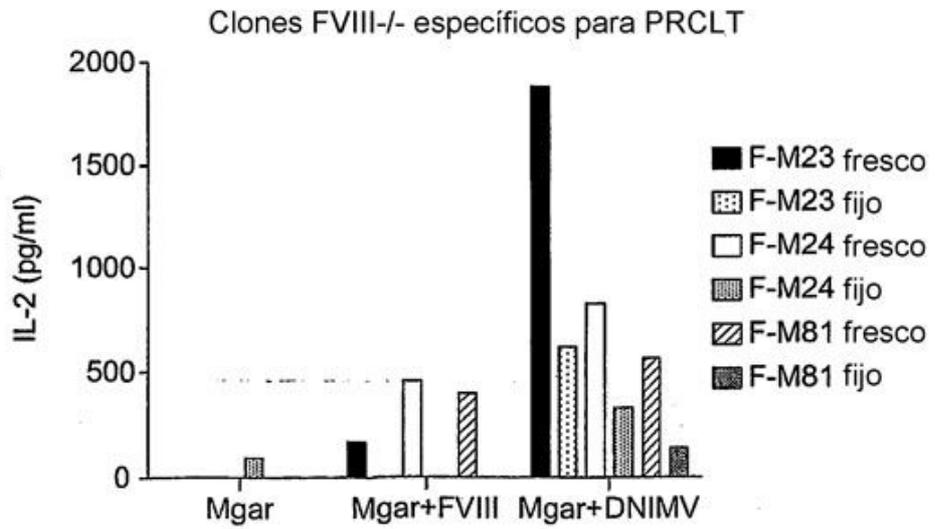
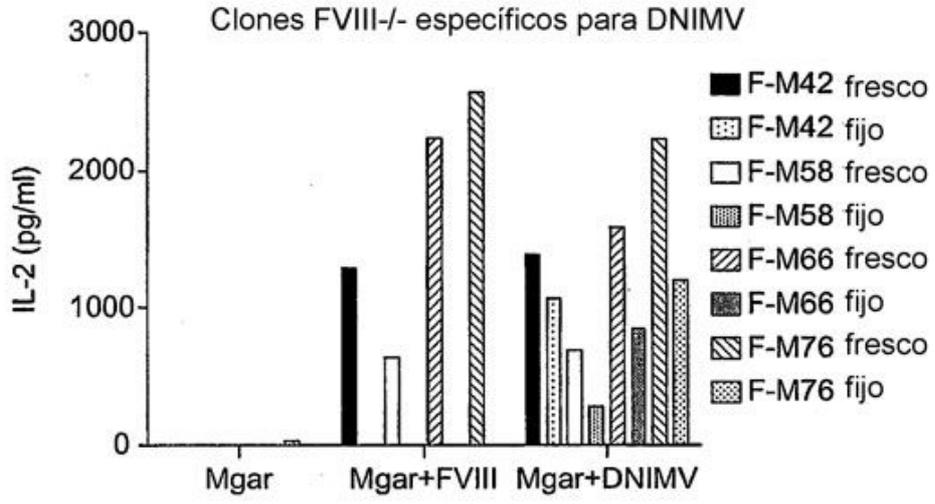


FIG. 6

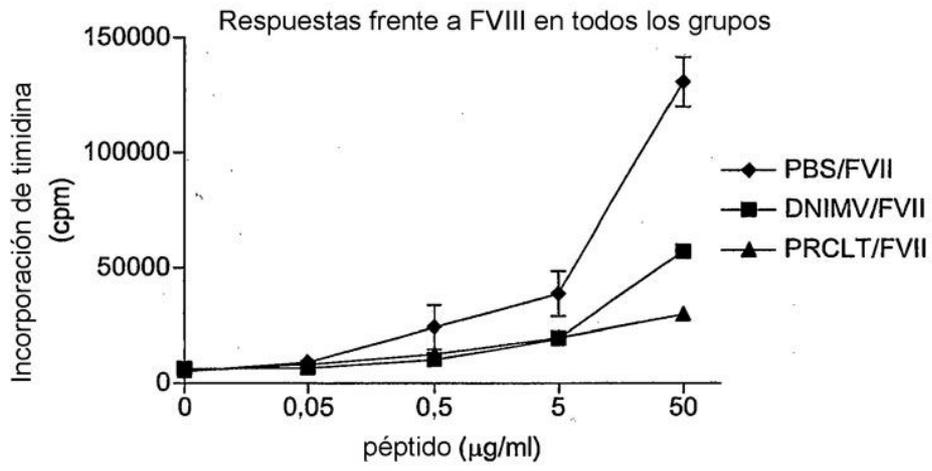


FIG. 7a

Producción de IL-2 media para péptidos DNIMV solapantes (8 clones)

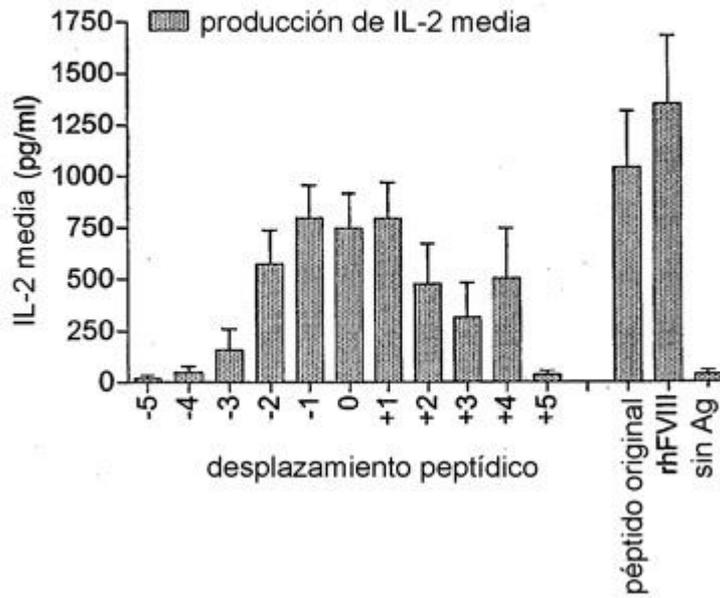


FIG. 7b

Producción de IL-2 media para péptidos PRCLT solapantes (4 clones)

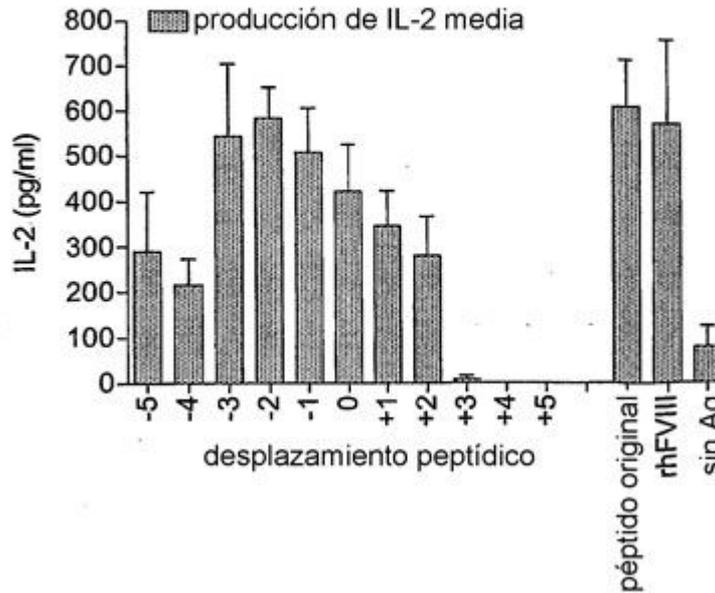


FIG. 7c

Producción de IL-2 media para péptidos solapantes PPIIA, DTLI, SLYIS y RYLRI

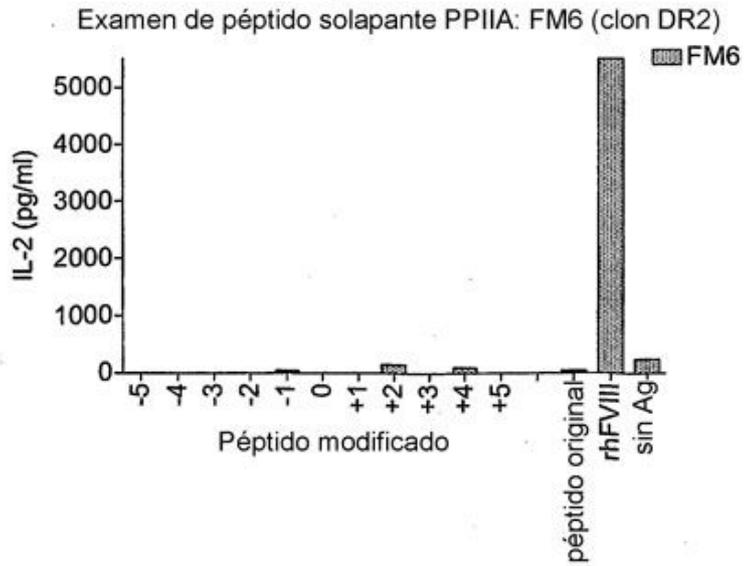
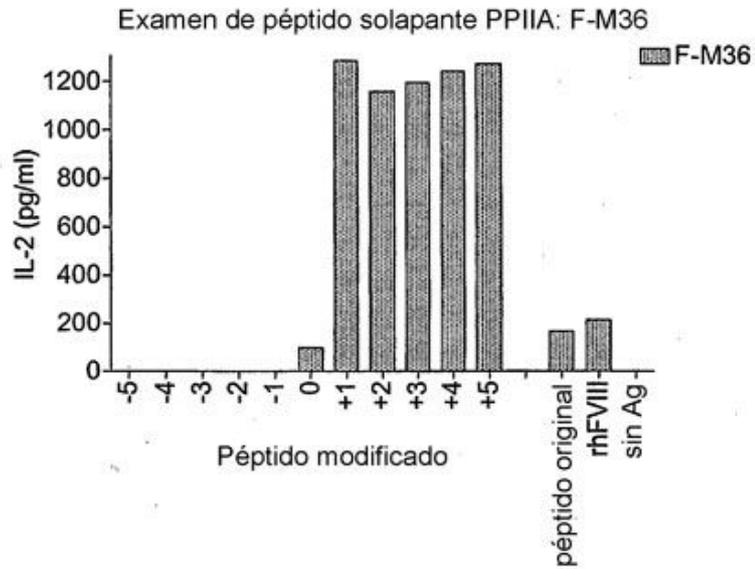


FIG. 7C CONT.

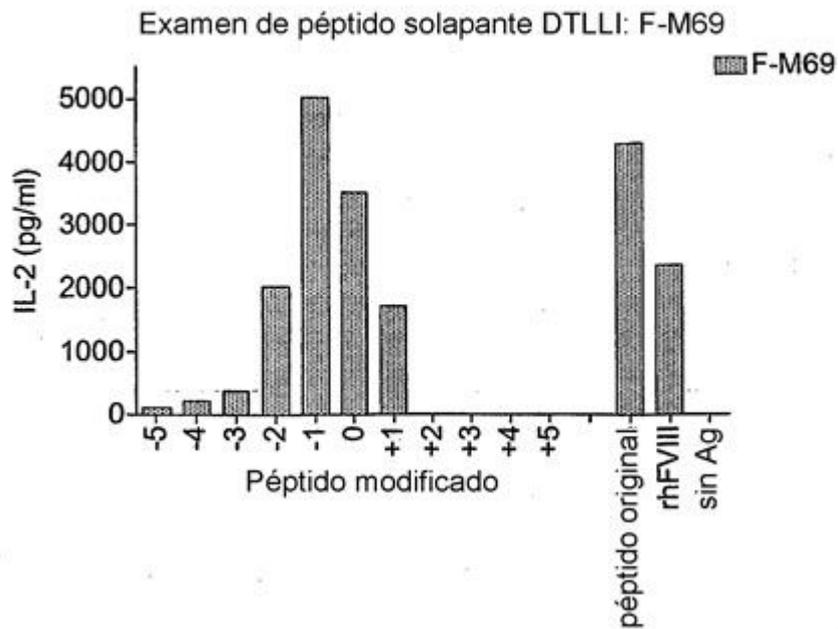
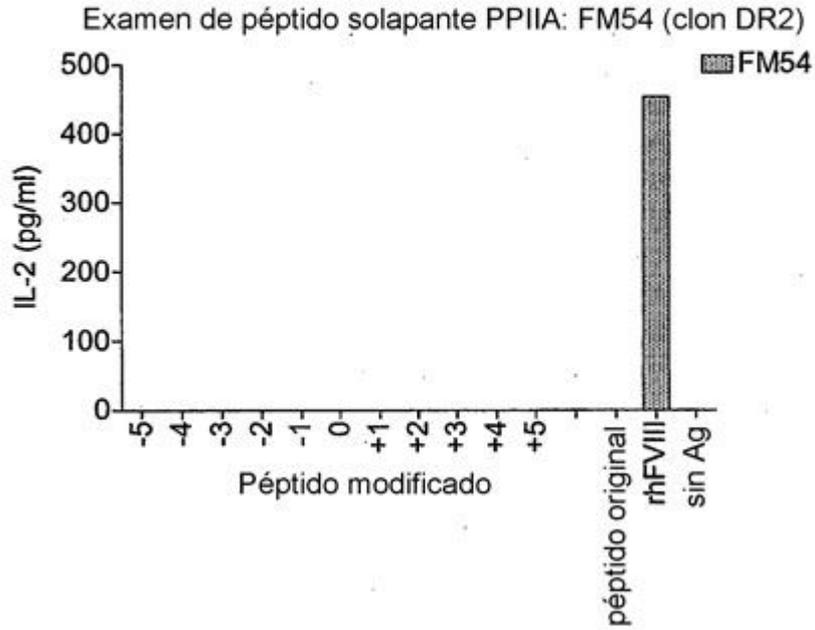


FIG. 7C CONT.

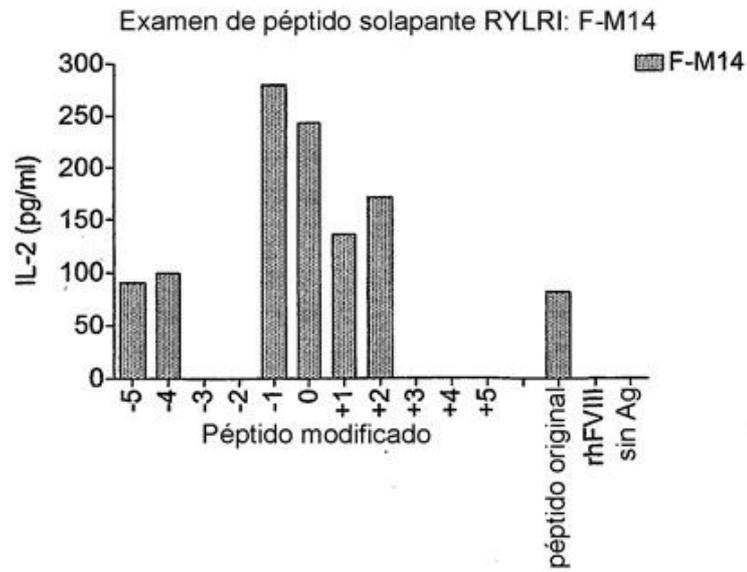
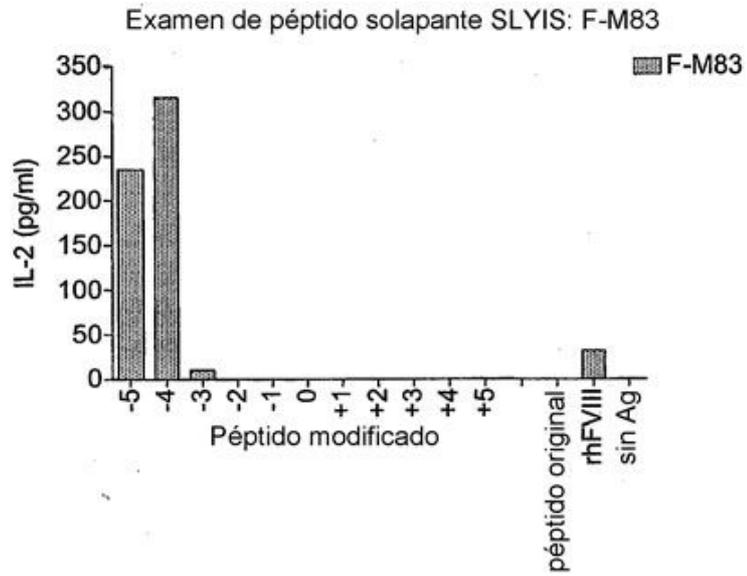


FIG. 8

