



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104903347 B

(45)授权公告日 2020.02.21

(21)申请号 201380069078.2

(22)申请日 2013.11.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104903347 A

(43)申请公布日 2015.09.09

(30)优先权数据
1220328.7 2012.11.12 GB
1316660.8 2013.09.19 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.07.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2013/060060 2013.11.11

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/072958 EN 2014.05.15

(73)专利权人 艾匹托普国际股份有限公司
地址 比利时迪彭贝克

(72)发明人 D.赖思 H.斯特里特

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/755(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 38/37(2006.01)

(56)对比文件

WO 02060917 A2,2002.08.08,

WO 2009095646 A2,2009.08.06,

CN 101889024 A,2010.11.17,

CN 102458445 A,2012.05.16,

Sugihara T等.Identification of

plasma antibody epitopes and gene abnormalities in Japanese hemophilia.

《Nagoya Journal of Medical Science》.2000,第63卷(第1/02期),全文.

Jones T D等.Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the c1 domain of factor VIII.《Journal of thrombosis and haemostasis》.2005,第3卷(第5期),991-1000.

审查员 吕健

权利要求书1页 说明书23页

序列表19页 附图8页

(54)发明名称

肽

(57)摘要

本发明提供了部分可衍生于FVIII的肽,其能够在不经进一步抗原处理的情况下结合MHC II类分子,并被VIII因子特异性T细胞识别。具体地,本发明提供了包含序列DNIMVTFRNQASRPY或PRCLTRYSSFVNME且具有N-和C-端修饰的肽。本发明也涉及这种肽在A型血友病和/或获得性血友病中阻止或抑制抑制物抗体形成的用途。

1. 一种包含FVIII衍生序列DNIMVTFRNQASRPY的肽,该肽由以下序列中的一项组成:
KKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No.17)
KKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No.18)
KKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No.19)
KEGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No.25)
KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No.26)
KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No.27)
EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No.29)
EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No.30) 和
EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No.31)。
2. 一种包含FVIII衍生序列PRCLTRYSSFVNME的肽,该肽由以下序列中的一项组成:
KKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No.1)
KKGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No.2)
KKGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No.3)
EEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No.5)
EEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No.7)
KEGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No.9)
KEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No.10)
KEGPRCLTRYSSFVNMEGKE (SEQ ID No.11) 和
EKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID No.13)。
3. 一种包含多种肽的组合物,其包括根据权利要求1或2的一种或多种肽。
4. 根据权利要求3的组合物,其包含根据权利要求1的至少一种肽和根据权利要求2的至少一种肽。
5. 根据权利要求4的组合物,其包含具有SEQ ID No.1的肽和具有SEQ ID No.17的肽。
6. 根据权利要求1或2的肽或根据权利要求3至5中任一项的组合物,其在体内抑制或阻止VIII因子抑制物抗体的产生中使用。
7. 根据权利要求1或2的肽或根据权利要求3至5中任一项的组合物在制备在体内抑制或阻止VIII因子抑制物抗体产生的药物中的用途。
8. 根据权利要求1或2的肽或根据权利要求3至5中任一项的组合物在制备用于在受试者中抑制或阻止VIII因子抑制物抗体产生的药物中的用途。
9. 根据权利要求1或2的肽或根据权利要求3至5中任一项的组合物在制备用于在受试者中治疗血友病的药物中的用途。
10. 根据权利要求8或9的用途,其中所述受试者患有A型血友病,并正经历或将要经历VIII因子置换疗法和/或FVIII绕过疗法。
11. 根据权利要求8或9的用途,其中所述受试者患有或有风险染上获得性血友病。
12. 根据权利要求8-11中任一项的用途,其中所述受试者是HLA-DR2。

肽

发明领域

[0001] 本发明涉及肽,其至少部分可衍生于VIII因子(FVIII)。所述肽可以用于减少或阻止VIII因子抑制物抗体的形成(例如在A型血友病治疗和获得性血友病中)。

[0002] 发明背景

[0003] 血友病

[0004] 血友病属于一组可遗传血液病症,其包括A型血友病、B型血友病(Christmas病)以及冯维勒布兰德氏病(Von Willebrand's disease)。

[0005] 在血友病中,由于基本凝血因子部分或完全缺失,血液凝结的能力严重降低,导致出血时间增加。

[0006] A型血友病是凝血因子VIII的缺陷,而B型血友病是凝血因子IX的缺陷。在两种疾病中,缺陷基因发现于X染色体上,因此这些病患是X连锁的。A型血友病比B型血友病常见五倍。

[0007] 血友病是一种终身的遗传基因病患,其影响作为携带者的女性以及遗传病患的男性。约三分之一的新诊断没有以前的家族史。其出现于世界各地,并在所有人种群体中发生。在英国,约有6000人受到血友病的影响。

[0008] 血友病患者在损伤后长时间出血。外部损伤例如割伤和擦伤通常不造成严重问题;通过应用一定程度的压力并覆盖受到影响的区域(例如使用膏药),通常可能止血。

[0009] 主要的问题是进入关节、肌肉和软组织的内出血,其可以自发发生。内出血例如进入脑部的出血非常难以应对,并可能致命。关节中的反复出血导致剧烈的疼痛并可能导致关节炎和/或长期关节损伤,导致残疾。

[0010] 血友病的治疗通常是通过置换缺失的凝血因子。在轻度或中度血友病中,可以在出血发生时给予注射(按需治疗)。然而,在重度血友病中,给予定期预防性注射来帮助血液凝结,并最小化长期关节损伤的可能性。

[0011] A型血友病的凝血因子置换疗法的潜在严重并发症是中和VIII因子促凝血功能的抗体的形成。VIII因子抑制物发生于大约25%的重度A型血友病中。由于患有先天性A型血友病的患者可能是FVIII遗传缺陷的,抑制物的合成是针对施用来阻止或治疗出血事件的外源蛋白的同种免疫应答。

[0012] CD4+T细胞在针对FVIII的免疫应答中扮演中心角色。在被抗原提呈细胞(APCs)吸收后,FVIII经历蛋白降解为肽片段(Reding等,(2006) Haemophilia 12(supp 6) 30-36)。这些肽然后与MHC II类分子联合,提呈在APC的表面。这一复合物然后被FVIII特异性的CD4+T细胞的T细胞受体识别。在合适的共刺激信号存在下,这一识别最终引起CD4+细胞指导B细胞的抗体合成。

[0013] 抑制物形成的发生率最初随着VIII因子治疗的数量而增加,但在50-100暴露天数后似乎达到稳定。抑制物的形成在重度血友病中比在中度或轻度疾病中更为常见,并且一些分子缺陷(最清楚的是VIII因子轻链中的大缺失和无义突变)似乎偏向于抑制物的形成。参数例如浓度、置换因子的类型(纯化的或重组的),以及治疗史也可能影响抗体产生的可

能性。

[0014] 带有抑制物的血友病患者的处理是持续的挑战。使用脱敏技术的免疫耐受诱导 (ITI) 在一些带有针对VIII因子的同种抗体的相同患者中是成功的。这种治疗方法要求对因子置换疗法的进行中的暴露,因此是一种长期的策略。

[0015] 虽然ITI可以是成功的,但相当大比例(约30%)的患者未能对ITI响应。带有高抑制物滴度的患者不太可能对治疗响应。另一个重要的影响因素是ITI开始时的年龄,当患者超过20岁时,成功率大幅下降 (Hay等, (2005) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32:15-21)。

[0016] 当ITI疗法不成功时,抑制物通常会存留一生,并且因为这些病人通常是高反应者,必须使用FVIII绕过产品(例如活化的凝血酶原复合物浓缩物 (FEIBA™),以及重组活化的FVII) 治疗出血事件。然而,这些试剂的使用与不良反应关联,例如弥散性血管内凝血,急性心肌梗塞,肺栓子和血栓形成 (Acharya和DiMichele (2006) *Best Practice&Research Clinical Haematology* 19:51-66)。

[0017] 免疫抑制疗法有时用于未能对ITI反应的患者。治疗包括施用免疫抑制药物例如环磷酰胺 (cyclophosphamide)、泼尼松 (prednisone)、硫唑嘌呤 (azathioprine) 和环孢素 (cyclosporine),其非特异性靶向免疫系统。这些治疗可以具有与一般的免疫抑制相关的副作用。

[0018] 对使用Rituximab™(一种针对B细胞CD20抗原的人源化单克隆抗体)的选择性B细胞耗竭有新的兴趣。然而,在一些使用这种药物治疗的儿童中发生了输注反应、血清病以及机会性感染 (DiMichele (2007) *J Thromb Haemost* 5:143-50)。

[0019] 获得性血友病

[0020] 获得性血友病是一种罕见的自身免疫病患,其在每百万人中影响1到4个人。在这种病患中,生来没有血友病的受试者形成出针对一种凝血因子例如VIII因子的抗体。据认为怀孕和自身免疫疾病例如类风湿性关节炎和癌症可能增加形成获得性血友病的风险。虽然引起其产生的根本免疫机制不同,在响应凝结因子置换疗法中产生的FVIII抑制物的临床表现和那些在获得性血友病中产生的FVIII抑制物的临床表现类似。

[0021] 获得性血友病患者具有接近25%的死亡率,部分因为获得性抑制物和严重出血并发症相关。获得性自身抗体抑制物的疗法主要是基于需要控制或阻止急性出血并发症(其通常威胁生命和肢体),其次是根除自身抗体来恢复正常凝血。

[0022] 一些与低滴度自身抗体抑制物(<5个Bethesda单位)相关的出血可以通过高剂量FVIII浓缩物的施用有效治疗。猪FVIII浓缩物曾经被认为是用于获得性血友病相关出血的重要一线疗法,因为它是提供在实验室中实际测量输注后FVIII凝结活性水平的机会的唯一置换疗法。因为猪血浆库被猪细小病毒污染,这一产品在2004年从市场上移除。现在,“绕过”试剂是最为常用的,但存在促凝性 (thrombogenicity) 的潜在风险,并且对于每个产品仅有约80%的效力。通过血浆除去法 (plasmapheresis) 和身体外免疫吸附的血浆置换对于临时减少抑制物滴度,使得足以绕过试剂或FVIII置换提供充分止血可以是必要的。

[0023] 自身抗体抑制物的根除依赖于免疫抑制措施,例如:(1) 在3-6周中施用30%-50%效力的皮质类固醇;(2) 使用细胞毒性和骨髓抑制性化疗试剂,例如环磷酰胺、环孢素、2-氯脱氧腺苷;(3) 使用静脉内免疫球蛋白的免疫调节;以及(4) 使用利普西单抗 (rituximab) 的

选择性B淋巴细胞耗竭。RituximabTM的响应者可能要求同时使用类固醇,而且复发可能响应再治疗。

[0024] 因此,所有目前可用的降低A型血友病治疗相关的同种抗体产生和获得性血友病中自身抗体产生的方法都有缺点。因此,需要改进的方法来在A型血友病和获得性血友病中解决抗FVIII抗体的问题。

[0025] 本发明的发明人已经发现,有可能通过使用FVIII衍生肽预耐受化 (pre-toerise) 患者来阻止FVIII抑制物抗体的形成,以及通过施用FVIII衍生肽以减少FVIII抑制物抗体来治疗病患,例如血友病。

[0026] 发明概述

[0027] 因此,本发明的第一个方面涉及能够诱导或恢复对FVIII的耐受性的肽,其至少部分序列衍生于FVIII。

[0028] 在本发明第一个方面的第一个实施方案中,本发明提供包含FVIII衍生序列DNIMVTFRNQASRPY的肽,其具有以下序列中的一项:

[0029] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.17)

[0030] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No.18)

[0031] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No.19)

[0032] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.25)

[0033] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No.26)

[0034] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No.27)

[0035] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.29)

[0036] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No.30) 以及

[0037] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No.31)。

[0038] 在第二个实施方案中,本发明提供包含FVIII衍生序列PRCLTRYSSFVNME的肽,其具有以下序列中的一项:

[0039] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.1)

[0040] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No.2)

[0041] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No.3)

[0042] Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.5)

[0043] Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No.7)

[0044] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.9)

[0045] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No.10)

[0046] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys (SEQ ID No.11) 以及

[0047] Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID No.13)。

[0048] 在第二个方面,本发明提供包含多种肽的组合物,其包括根据本发明第一个方面的一种或多种肽。

[0049] 所述组合物可以包含根据本发明第一个方面的第一个实施方案的至少一种肽和根据第二个实施方案的至少一种肽。

[0050] 所述组合物可以包含具有SEQ ID NO.1的肽和具有SEQ ID NO.17的肽。

[0051] 所述组合物可以是试剂盒的形式,其中所述多种肽是分开提供的,用于分开、随后、序贯或同时施用。

[0052] 本发明的所述肽或试剂盒可以用于抑制、减轻或阻止VIII因子抑制物抗体的形成。

[0053] 本发明还提供了此类肽或组合物在制造抑制、减少或阻止VIII因子抑制物抗体形成的药物中的用途。

[0054] 本发明也提供用于抑制、阻止或减少受试者中VIII因子抑制物抗体的形成的方法,其包含将这种肽或组合物施用于所述受试者的步骤。

[0055] 所述受试者可以是FVIII缺陷的,特别是所述受试者可以具有A型血友病,并可以或即将经历VIII因子置换疗法。

[0056] 或者,所述受试者可以具有或有风险染上获得性血友病。

[0057] VIII因子抑制物在表达HLA-DR2的个体中更常找到。因此,通过本发明所述方法治疗的受试者可以是HLA-DR2阳性的。

[0058] 附图简述

[0059] 图1:修饰的FVIII肽的溶解度

[0060] 共测试了32种肽:其中16种基于FVIII肽PRCLTRYSSFVNME (“PRCLT”) (SEQ ID No.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13);16种基于FVIII肽DNIMVTFRNQASRPY (“DNIMV”) (SEQ ID No.17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32)。测试了其相对于无关对照肽(4Y)的溶解度,已知所述无关对照肽对于作为耐受化抗原的应用是足够可溶的。在图表中,绿色代表至少与4Y一样可溶的肽,橙色代表不太与4Y一样可溶,但相当接近的肽,红色代表不与4Y一样可溶的肽。编码为绿色的肽与对照肽4Y一样可溶,编码为红色的肽难溶,而编码为琥珀色的一种肽具有中间溶解度。

[0061] 图2:标记的肽(tagged peptide)在水溶液中的溶解度。

[0062] 溶解于DMSO(对照)或PBS后,溶液中肽的浓度通过分光光度计确定,并与预期值4mg/ml比较。实际和预期浓度间较大的差距对应较低的相对溶解度。

[0063] 图3:标记的肽起apitopes作用。

[0064] 使用新鲜的和固定的抗原呈递细胞进行抗原呈递测定法来研究标记肽是否与亲代肽PRCLT和DNIMV一样能够结合MHC分子,并在不经抗原处理的情况下被呈递给T细胞。(a) PRCLT肽;(b) DNIMV肽。

[0065] 图4:具有SEQ ID No.1和SEQ ID No.2的肽调节对PRCLT的T细胞应答。

[0066] 本图显示了来自用SEQ ID No.1、SEQ ID No.2或对照(PBS)处理并用PRCLT引发的HLA-DR2转基因小鼠的回忆应答(recall response)。在一定范围的肽浓度间且针对FVIII以及对照PPD显示T细胞刺激指数。

[0067] 图5:具有SEQ ID No.17和SEQ ID No.18的肽调节对DNIMV的T细胞应答。

[0068] 本图显示了来自用SEQ ID No.17、SEQ ID No.18或对照(PBS)处理并用DNIMV引发的HLA-DR2转基因小鼠的回忆应答。在一定范围的肽浓度间且针对FVIII以及对照PPD显示T细胞刺激指数。

[0069] 图6:具有SEQ ID No.1和SEQ ID No.17的肽调节对其亲代肽的T细胞应答。

[0070] 本图显示了来自用SEQ ID No.1或SEQ ID No.17或对照(PBS)处理并用PRCLT和DNIMV引发并且在体外用PRCLT、DNIMV或FVIII回忆的HLA-DR2转基因小鼠的回忆应答。在一定范围的肽浓度间和针对FVIII显示T细胞刺激指数。有对亲代肽的T细胞应答的显著抑制。

[0071] 图7:具有SEQ ID No.1的肽和具有SEQ ID No.17的肽的联合抑制体内抗FVIII抗体的产生。

[0072] 本图显示了使用SEQ ID No.1和SEQ ID No.17(或对照PBS)联合处理并使用8次每周FVIII免疫法免疫的小鼠的终点抗FVIII抗体滴度。

[0073] 图7a:第28天的结果

[0074] 图7b:第56天的结果

[0075] 图8:具有SEQ ID No.1的肽和具有SEQ ID No.17的肽的联合阻止FVIII暴露后体内中和性抗FVIII抗体的产生。

[0076] 本图显示了在8次每周FVIII免疫法之前或期间,使用SEQ ID No.1和SEQ ID No.17(或对照PBS)联合处理的小鼠中,中和性抗FVIII抗体的水平。在第56天,在使用肽治疗的小鼠中中和性抗体有显著下降。

[0077] 图9:具有SEQ ID No.1的肽和具有SEQ ID No.17的肽的联合抑制对FVIII的T细胞应答。

[0078] 本图显示了来自用SEQ ID No.1和SEQ ID No.17或对照(PBS)联合处理并用DNIMV和PRCLT引发的HLA-DR2转基因小鼠的回忆应答。在一定范围的FVIII浓度间显示T细胞刺激指数。

[0079] 图10:具有SEQ ID No.1的肽和具有SEQ ID No.17的肽的联合在具有正在进行FVIII免疫反应的治疗动物模型中抑制中和性抗FVIII抗体产生。

[0080] 本图显示在诱导FVIII免疫反应和抗FVIII抗体产生后,使用SEQ ID No.1和SEQ ID No.17或前列腺酸性磷酸酶(PAD)133-152对照肽(序列描述于PCT/US2006/031961,SEQ

ID NO.15) 处理的小鼠中, 中和性抗FVIII抗体的水平。小鼠在rFVIII免疫法后3周和rFVIII增强免疫之前, 接受肽处理。在FVIII增强免疫后两周(第7周), 在肽处理的小鼠中, 中和性抗FVIII抗体有显著的减少, 并在实验过程中维持直到第13周。

[0081] 发明详述

[0082] 肽

[0083] 本发明涉及肽。

[0084] 术语“肽”用在正常意义下表示通常通过 α -氨基和相邻氨基酸的羧基基团之间的肽键彼此相连的一系列残基(通常是L-氨基酸)。所述术语包括修饰的肽和合成的肽类似物。

[0085] 本发明的肽可以使用化学方法(Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.) 制造。例如, 肽可以通过固相技术(Roberge JY等, (1995) Science 269:202-204) 合成, 从树脂上切下, 并通过制备用高效液相色谱法(例如Creighton(1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY) 纯化。可以实现自动化合成, 例如, 依照制造商提供的说明书使用431A肽合成器(Perkin Elmer) 进行。

[0086] 或者, 所述肽可以通过重组方法, 或通过从VIII因子切割肽, 接着修饰一个末端或两个末端生成。肽的构成可以通过氨基酸分析或测序(例如Edman降解程序) 来确认。

[0087] 为了实践目的, 存在着肽可以显示的各种其它特性。例如, 重要的是, 肽在体内足够稳定, 从而是治疗上有用的。所述肽的体内半衰期可以为至少10分钟、30分钟、4小时、或24小时。

[0088] 所述肽可以也表现出良好的体内生物利用度。肽可以维持使其能够在无过多阻碍的情况下结合细胞表面的MHC分子的体内构象。

[0089] Apitopes

[0090] 在适应性免疫反应中, T淋巴细胞能够识别蛋白抗原的内部表位。抗原呈递细胞(APC) 摄取抗原并将其降解为短的肽片段。肽可以结合细胞内的主要组织相容性复合体(MHC) I类或II类分子, 并被携带到细胞表面。当与MHC分子相连被呈递到细胞表面时, 所述肽可以被T细胞识别(通过T细胞受体(TCR)), 在这种情况下所述肽是T细胞表位。

[0091] 因此, 表位是可衍生于抗原的肽, 其能够结合MHC I类或II类分子的肽结合沟, 并被T细胞识别。

[0092] 最小表位是可衍生于表位的最短片段, 其能够结合MHC I类或II类分子的肽结合沟, 并被T细胞识别。对于给定的免疫原性区, 通常可能产生起表位作用的重叠肽的“嵌套集合(nested set)”, 它们全部包含最小表位, 但在其侧翼区上不同。

[0093] 出于同样的原因, 对于特定的MHC分子: T细胞联合, 可能通过测量对于截短肽的响应鉴定最小表位。例如, 如果对重叠库中包含残基1-15的肽获得响应, 可以使用在两端截短的组(即1-14、1-13、1-12等, 以及2-15、3-15、4-15等) 来鉴定最小表位。

[0094] 本发明的发明人之前已经确定了肽在不经进一步抗原处理的情况下结合MHC I或II类分子并被呈递给T细胞的能力和肽在体内诱导耐受性的能力之间有联系(WO 02/16410)。如果肽太长以至于在不经进一步处理(例如修剪) 的情况下不能结合MHC分子的肽结合沟, 或以不适当的构象结合, 则其在体内将不会是致耐受性的。另一方面, 如果所述

肽的大小和构象适合于直接结合MHC肽结合沟,并被呈递给T细胞,则这种肽可以预测为对于诱导耐受性是有用的。

[0095] 因此,可能通过研究其在没有进一步抗原处理的情况下能否在体外结合MHC I或II类分子并被呈递给T细胞来研究肽的致耐受性能力。

[0096] 本发明所述的肽是apitopes (抗原处理非依赖性表位, Antigen Processing-Independent epiTOPES), 因为其能够在不经进一步抗原处理的情况下结合MHC II类分子并刺激来自VIII因子特异性T细胞的应答。根据描述于WO 02/16410的基于规则的方法, 可以预测这种apitopes导致对FVIII的耐受性。

[0097] 本发明的肽可以是任何长度, 其能够在不经进一步处理的情况下结合MHC I或II类分子。典型地, 本发明的所述肽能够结合MHC II类分子。

[0098] 结合MHC I类分子的肽的长度通常为7到13, 更通常8到10个氨基酸。肽的结合在其两端通过肽主链和所有MHC I类分子的肽结合沟中的不变位点中的原子之间的接触稳定。在沟的两端有不变位点, 其结合肽的氨基和羧基端。肽长度的变化通过所述肽主链中通常在允许所需柔性的脯氨酸或甘氨酸残基的扭结来适应。

[0099] 结合MHC II类分子肽通常为长度8到20氨基酸, 更通常长度10到17个氨基酸长, 可以更长(例如多达40个氨基酸)。这些肽沿着(与MHC I类肽结合沟不同)在两端开口的MHC II肽结合沟以伸展构象展开。所述肽主要通过主链原子与作为肽结合沟衬里的保守残基的接触保持在适当位置。

[0100] 肽序列

[0101] 本发明的第一个实施方案涉及包含FVIII衍生序列的肽。实施例中所研究的FVIII衍生序列具有以下序列

[0102] SEQ ID No.1:

[0103] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

[0104] SEQ ID No.2:

[0105] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

[0106] SEQ ID No.3:

[0107] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

[0108] SEQ ID No.4:

[0109] Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu

[0110] SEQ ID No.5:

[0111] Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

[0112] SEQ ID No.6:

[0113] Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

- [0114] SEQ ID No.7:
[0115] Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys
[0116] SEQ ID No.8:
[0117] Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu
[0118] SEQ ID No.9:
[0119] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys
[0120] SEQ ID No.10:
[0121] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu
[0122] SEQ ID No.11:
[0123] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys
[0124] SEQ ID No.12:
[0125] Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu
[0126] SEQ ID No.13:
[0127] Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys
[0128] SEQ ID No.14:
[0129] Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu
[0130] SEQ ID No.15:
[0131] Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys
[0132] SEQ ID No.16:
[0133] Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu
[0134] SEQ ID No.17:
[0135] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys
[0136] SEQ ID No.18:
[0137] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu
[0138] SEQ ID No.19:
[0139] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

[0140] SEQ ID No.20:

[0141] Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

[0142] SEQ ID No.21:

[0143] Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

[0144] SEQ ID No.22:

[0145] Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

[0146] SEQ ID No.23:

[0147] Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

[0148] SEQ ID No.24:

[0149] Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

[0150] SEQ ID No.25:

[0151] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

[0152] SEQ ID No.26:

[0153] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

[0154] SEQ ID No.27:

[0155] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

[0156] SEQ ID No.28:

[0157] Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu

[0158] SEQ ID No.29:

[0159] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys

[0160] SEQ ID No.30:

[0161] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu

[0162] SEQ ID No.31:

[0163] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys.

[0164] SEQ ID No.32:

[0165] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu.

- [0166] 术语“具有”意图用于表示所述肽组成为所给的氨基酸序列。
- [0167] 本发明提供了肽,其包含序列DNIMVTFRNQASRPY,并具有下述序列中的一项:SEQ ID No.17、18、19、25、26、27、29、30或31。
- [0168] 所述肽可以具有以下序列中的一项:SEQ ID No.17、18、25或26。
- [0169] 所述肽可以具有SEQ ID No.17或18。
- [0170] 所述肽可以具有SEQ ID No.17。
- [0171] 本发明也提供了肽,其包含序列PRCLTRYSSFVNME,并具有以下序列中的一项:SEQ ID No.1、2、3、5、7、9、10、11或13。
- [0172] 所述肽可以具有以下序列中的一项:SEQ ID No.1、2、9或10。
- [0173] 所述肽可以具有SEQ ID No.1或2。
- [0174] 所述肽可以具有SEQ ID No.1。
- [0175] VIII因子
- [0176] 形成本发明所述肽的中心部位的序列DNIMVTFRNQASRPY和PRCLTRYSSFVNME都衍生于VIII因子。
- [0177] VIII因子参与血液凝固的内在途径;VIII因子是IXa因子的辅因子,其在Ca²⁺和磷脂质的存在下,将X因子转换为活化形式的Xa。
- [0178] VIII因子基因产生两种可变剪切转录物。转录物变体1编码一种大糖蛋白(同种型a),其在血浆中循环,并与非共价复合物中的冯维勒布兰德因子(von Willebrand factor)联合。这种蛋白经历多次剪切事件。转录物变体2编码一种推定的小蛋白(同种型b),其主要组成为VIIIc因子的磷脂质结合域。这一结合域对于凝血剂活性是至关重要的。
- [0179] 人VIII因子基因的完整186,000个碱基对序列在20世纪80年代中期被阐明(Gitschier等,(1984)Nature 312326-330)。同时,编码完整的2351个氨基酸序列的DNA克隆被用于在培养的哺乳动物细胞中生产生物活性的VIII因子(Wood等,(1984)Nature 312:330-337)。人VIII因子完整的2351个氨基酸的序列提供在SEQ ID No.33中。
- [0180] 溶解度
- [0181] 本发明第一个实施方案的肽是一种以下肽的修饰形式
- [0182]
- | |
|-----------------|
| DNIMVTFRNQASRPY |
| PRCLTRYSSFVNME |
- [0183] 已经显示这些肽起apitopes的作用并且是体内致耐受的(见实施例和国际专利申请号PCT/GB2008/003996)。
- [0184] 自此之后已经为人所知的是在肽介导的耐受性诱导中,溶解度是一个重要的考虑。
- [0185] 本发明人发现了溶解度可以通过在两端掺入甘氨酸间隔物,随后通过在N和C端的两个额外氨基酸的联合来改善,所述额外的氨基酸可以是赖氨酸(K)和/或谷氨酸(E)。因此,在所给末端的可能的组合为KK、KE、EK或EE。
- [0186] 因此,本发明的修饰的肽相比亲代DNIVM和PRCLT肽具有6个额外的氨基酸(每端3个)。
- [0187] 本发明所述肽具有以下通式:
- [0188] XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX或

[0189] XXGPRCLTRYSSFVNMEGXX

[0190] 其中X是赖氨酸或谷氨酸。

[0191] 所述修饰的肽可以比亲代(未修饰的)肽更可溶。修饰的肽可以具有比亲本肽大2、3、4或5倍的溶解度。所述肽可以在浓度高达0.5mg/ml、1mg/ml或5mg/ml时可溶。

[0192] 耐受性

[0193] T细胞表位在对任何抗原(不论自身或外源的)的适应性免疫反应中扮演中心角色。T细胞表位在超敏感性疾病(其包括过敏、自身免疫性疾病和移植物排斥)中所扮演的中心角色已经通过实验模型的使用证明。通过注射合成肽(基于T细胞表位的结构)联合佐剂可能诱导炎性或过敏性疾病。

[0194] 比较而言,已经显示了可能通过施用可溶形式的肽表位来诱导对特定抗原的免疫耐受性。可溶性肽抗原的施用已被证明为一种在实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE:一种多发性硬化症(MS)的模型)(Metzler和Wraith(1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165;Liu和Wraith(1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263;Anderton和Wraith(1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261);以及在关节炎、糖尿病和葡萄膜视网膜的实验模型中(综述于Anderton和Wraith(1998)同上)中抑制疾病的有效手段。这也被证明是在EAE中治疗正在进行的疾病的一种方法(Anderton和Wraith(1998)同上)。

[0195] 耐受性是未能对抗原应答。对自身抗原的耐受性是免疫系统的基本特点,当这失去时可以导致自身免疫性疾病。适应性免疫系统必须保持对极其多种感染原的响应的能力,同时避免自身免疫攻击在其自身组织中所包含的自身抗原。这在很大程度上通过胸腔中未成熟的T淋巴细胞对凋亡性细胞死亡的敏感性来控制(中心耐受性)。然而,并非所有的自身抗原都在胸腔被检测到,因此自身反应性胸腺细胞的死亡仍然不完全。因此,也存在外周组织中的成熟自身反应性T淋巴细胞获得耐受性的机制(外周耐受性)。中枢和外周耐受性机制的综述参见Anderton等,(1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137)。

[0196] 在A型血友病中,患者在VIII因子基因中有缺陷。这表示VIII因子不被免疫系统识别为“自身”抗原。因此,当在凝血因子置换疗法中施用VIII因子时,产生了针对外源蛋白的同种免疫反应,导致FVIII抑制物抗体的产生。

[0197] 本发明的肽能够诱导对VIII因子的耐受性,使得当FVIII预防性施用时,其不诱导免疫反应,并且FVIII的抑制物不形成;当其治疗性施用时,减少或抑制进行中的FVIII抑制物产生。

[0198] 获得性血友病是一种自身免疫性疾病,其中对VIII因子的耐受性失效。在这种情况下,可以施用本发明的肽来恢复对这种自身蛋白的耐受,以及减轻致病性免疫反应。

[0199] 耐受性可以源自或特征在于在至少部分CD4⁺T细胞中诱导无反应力。为了激活T细胞,肽必须与能够向T细胞传递两种信号的“专门的”APC联合。第一信号(信号1)由APC细胞表面上的MHC-肽复合物传递,并且通过TCR被T细胞接收。第二信号(信号2)由APC表面上的共刺激分子(如CD80和CD86)传递,并且通过T细胞表面上的CD28接收。据认为,当T细胞在不存在信号2的情况中接收信号1时,其不被激活,并且实际上变为无反应力的。无反应力的T细胞对于后续抗原攻击是不起反应的,并且可以能够抑制其它免疫反应。无反应力的T细胞被认为参与介导T细胞耐受性。

[0200] 不希望受理论的束缚,本发明人预测在其能够与MHC分子一起被呈递之前需要处

理的肽不诱导耐受性,因为其必须被成熟的抗原呈递细胞处理。成熟的抗原呈递细胞(例如巨噬细胞、B细胞和树突细胞)能够处理抗原,而且还能向T细胞传递信号1和信号2两者,导致T细胞活化。另一方面,Apitopes将能够结合未成熟APC上的II类MHC。因此,它们在没有共刺激下被呈递给T细胞,导致T细胞无反应力和耐受性。

[0201] 当然,apitopes也能够结合成熟APC细胞表面的MHC分子。然而,相比成熟APC,免疫系统包含更丰富的未成熟APC(已经提出少于10%的树突细胞是激活的,Summers等,(2001) Am.J.Pathol.159:285-295)。因此,apitope的默认位置为无反应力/耐受性,而非激活。

[0202] 可以通过本领域的已知技术通过查看下列各项的水平降低在体内监控对FVIII的耐受性的诱导:

[0203] (i) FVIII抑制性抗体;

[0204] (ii) FVIII特异性的CD4+T细胞;

[0205] (iii) 能够分泌FVIII抑制性抗体的B细胞。

[0206] 因此,耐受性的诱导也可以通过各种技术监控,包括:

[0207] (a) 在CD4+T细胞中诱导无反应力(其可以通过体外FVIII的后续激发来检测)。

[0208] (b) CD4+T细胞群的改变,包括

[0209] (i) 增殖的减少;

[0210] (ii) IL-2、IFN- γ 和IL-4产生的下调;以及

[0211] (iii) IL-10产生的增加。

[0212] 如本文使用的,术语“致耐受的”表示能够诱导耐受性。

[0213] 组合物

[0214] 本发明也涉及组合物,如包含根据本发明的一种或多种肽的药学组合物。

[0215] 所述组合物可以包含肽DNIMVTFRNQASRPY的修饰形式和肽PRCLTRYSSFVNME的修饰形式。

[0216] 所述肽可以包含多种肽,例如,两种、三种、四种、五种或六种肽。

[0217] 本发明的所述组合物可以用于预防性或治疗性用途。

[0218] 当用于预防性用途施用,所述组合物可以减少或阻止对FVIII的免疫应答的产生。免疫应答的水平小于尚未使用所述组合物治疗的患者中会获得的水平。术语“减少”指示观察到免疫应答的部分减少,如在尚未使用所述组合物治疗的患者中观察到的应答(或在未治疗的患者中相同时间范围内观察到的应答)的50%、70%、80%或90%减少。术语“预防”指示没有观察到可感知的对FVIII的免疫应答。

[0219] 当用于治疗性用途施用,所述组合物可以抑制已经在进行的对FVIII的免疫应答。术语“抑制”指示与肽治疗之前的水平相比,或与尚未给予治疗在相同时间点时观察到的水平相比正在进行的免疫应答水平的降低。

[0220] 使用本发明所述组合物的治疗可能导致以下任意项或所有项的水平降低:

[0221] (i) FVIII抑制性抗体

[0222] (ii) FVIII特异性CD4+T细胞

[0223] (iii) 分泌FVIII抑制性抗体的B细胞。

[0224] 所有这些因子的检测可以使用本领域已知技术(如ELISA、流式细胞术、显色凝血试验等)实施。

[0225] 使用本发明所述组合物的治疗也或备选可以导致FVIII特异性的CD4+T细胞的无反应力。无反应力可以通过例如在体外用FVIII的后续攻击检测到。

[0226] 重要的是记住不是所有对FVIII的免疫应答都是致病的。非抑制性抗FVIII抗体可以在没有抑制物的血友病患者 (Moreau等, (2000) Blood95:3435-41) 和约15%的健康献血者 (Algiman等, (1992) 89:3795-9) 中发现。

[0227] FVIII抑制物可以通过凝血Bethesda测定法的Nijmegen修改来检测,其中检测患者血浆使正常血浆中的FVIII失活的能力。Bethesda单位定义为中和50%血浆FVIII活性的抗体量,并且滴度0.6BU或更高提示抗体的存在。

[0228] 抑制物通常被分为低滴度(如果所述水平<5BU)和高滴度(如果所述水平 $\geq$ 5BU)。

[0229] 循环FVIII抑制物抗体的水平可以减少到对尚未接受治疗的患者会观察到的抗体水平的90%、75%、50%、20%、10%、5%。

[0230] 循环FVIII抑制性抗体的水平可以减少到5、4、3、2、1或0.5个BU。

[0231] 本发明的所述肽和组合物可以增加可用于帮助患者凝血的治疗性施用的FVIII的量或比例。这是由于FVIII抑制物的减少,所述FVIII抑制物可以消除一定比例的FVIII,从而不能执行其治疗功能。本发明的所述肽或组合物可以将可用FVIII的量增加例如10%、25%、50%、75%或100%。

[0232] 因此,本发明的所述肽和组合物可以减少患者中帮助凝血需要施用的FVIII量。

[0233] 制剂

[0234] 所述组合物可以制备为可注射液(作为液体溶液或悬浮液);也可以制备成注射前适于在液体中溶解或悬浮的固体形式。也可以乳化制剂,或在脂质体中包囊肽。活性成分可以与赋形剂混合,所述赋形剂是药学上可接受的并且与所述活性成分相容。适合的赋形剂是例如水、盐水(例如磷酸盐缓冲盐水)、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。

[0235] 另外,如果需要,组合物可以包含少量的辅助物质,例如润湿或乳化剂和/或pH缓冲试剂。缓冲盐包括磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、盐酸盐和/或可以使用氢氧化钠进行pH调节。对于稳定化,可以使用二糖,如蔗糖或海藻糖。

[0236] 如果所述组合物包含多种肽,那么所述肽的相对比率可以大约相等。或者,每种肽的相对比例可以是改变的,例如,以将致耐受性应答聚焦于特定的自身反应性T细胞子集,或如果发现一种肽比其它肽在特定的HLA类型中更好起作用。

[0237] 配制后,所述组合物可以掺入到无菌的容器中,其然后被密封并储存于低温,例如4℃或它可以被冻干。

[0238] 便利地,组合物被制备为冻干(冷冻干燥)粉。冻干允许以稳定形式长期储存。冻干步骤是本领域众所周知的,见例如<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>。在冷冻干燥前通常使用膨胀剂(bulking agent),例如甘露醇、右旋糖酐或甘氨酸。

[0239] 组合物可以通过方便的方式施用,例如通过口服、静脉内(其水溶性的情况中)、肌肉内、皮下、舌下、鼻内、皮内或栓剂途径或植入(例如使用缓慢释放分子)。

[0240] 组合物可以有利地通过鼻内、皮下或皮内途径施用。

[0241] 本发明的所述肽和组合物可以用于治疗人类受试者。受试者可以患有A型血友病,尤其是重度A型血友病。受试者可以是FVIII遗传缺陷的。受试者可以患有获得性血友病。受

试者可以具有抑制性抗FVIII抗体。

[0242] 受试者可以正经历或将要经历使用FVIII的凝血剂置换疗法。

[0243] 受试者可以正经历或将要经历使用绕过试剂的疗法(有或没有使用FVIII的凝血剂置换疗法)。

[0244] 受试者可以正经历或将要经历使用FVIII基因的基因疗法。

[0245] 受试者可以是与有形成抑制性抗FVIII同种抗体或自身抗体的素因相关的HLA单倍型(haplotype)。受试者可以表达HLA-DR2。确定个体HLA单倍型的方法是本领域已知的。

[0246] 典型地,内科医师将确定最适合用于个体受试者的实际剂量,并且它随着具体患者的年龄、体重和反应而变化。

[0247] 在一个优选的实施方案中,可以遵循“剂量递增”方案,其中以上升浓度对患者给予多种剂量。例如,已经在针对蜂毒液过敏性的免疫治疗应用中对磷脂酶A2肽应用这种方法(Müller等,(1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754和Akdis等,(1998) J. Clin. Invest. 102:98-106)。

[0248] 试剂盒

[0249] 便利地,如果所述组合物包含多种肽,那么它们可以以混合的组合物或混合物的形式一起施用。然而,可以存在着如下的情况,其中优选以试剂盒的形式分开提供所述肽,用于同时、单独、序贯或联合施用。

[0250] 所述试剂盒也可以包含混合和/或施用方式(例如用于鼻内施用的蒸发器(vapouriser),或用于皮下/皮内剂量给药的注射器或针)。所述试剂盒也可以包含使用说明书。

[0251] 本发明所述的药物组合物或试剂盒可以用于治疗和/或预防疾病。

[0252] 具体地,组合物/试剂盒可以用于治疗和/或预防A型血友病或获得性血友病患者中抗FVIII抑制物的形成。组合物/试剂盒可以用于治疗以中和性FVIII抗体的存在受损害的血友病。

[0253] A型血友病

[0254] A型血友病(经典血友病)是由VIII因子的缺陷导致的。

[0255] A型血友病估计发病率为10000位男性中1位,而B型血友病估计为发生于40000位男性中1位。5000女性中约1位是A型血友病的携带者,并且20000中的1位是B型血友病的携带者。

[0256] 基于血液中凝血因子的水平,血友病通常分为三类:重度、中度和轻度。在重度血友病中,有少于1%的正常凝血因子。严重程度在世代之间倾向于是一致的。

[0257] 与大众看法相反,小的割伤和创伤对血友病患者通常不呈现威胁。更确切地,最大的危险来自于可能发生在关节和肌肉中的自发出血。这在快速生长的年龄期间(通常在年龄5和15岁之间)最倾向于发生。

[0258] 关节中反复的自发出血可导致关节炎,以及相邻肌肉变得虚弱。由于血液的积累导致的对神经的压力可以导致疼痛、麻木以及暂时无法移动受影响的区域。

[0259] A型血友病通常使用血液测试来诊断,所述血液测试用于确定凝血效率以及研究凝血因子水平是否异常。

[0260] 20世纪70年代从捐献的血液中分离的纯化凝血因子的开发显著改善了血友病患

者的长期展望。轻度到中度的血友病患者可以按特设基础使用FVIII治疗,而重度血友病患者可能需要定期的无限期治疗。

[0261] 以前,对患者给予从数千份血浆捐献合并的VIII因子浓缩物。这引起了病毒病原污染的严重问题,尤其是人类免疫缺陷病毒和肝炎病毒。单克隆抗体纯化技术、热失活和杀病毒去污剂处理使得血浆来源的浓缩物相对安全。

[0262] 重组DNA技术现在已经提供了可一系列合成产品,例如Recombinate™和Kogenate™。Kogenate使用表达人VIII因子的幼仓鼠肾细胞制备。产生的因子是高度纯化的,消除任何从血浆传递病毒的可能性。

[0263] 本发明的所述肽或组合物可以在VIII因子置换疗法之前和/或期间施用。

[0264] A型血友病是一种用于基因疗法的理想疾病目标,因为i) 其由单个鉴定基因中的突变导致,ii) 体内凝血因子水平的略微上升可以将重度血友病转变为更轻微的疾病,iii) 认为目前的置换疗法是亚最佳的。还有,如果有凝血活性的期望水平的“过调量(overshoot)”,那么有较宽的安全性范围。

[0265] 不幸的是,至今基因疗法作为血友病治愈的希望还没有被实现,主要因为难以找到非免疫原性足以允许长期表达凝血因子的基因传递系统。

[0266] 本发明的所述肽也适合用于在使用VIII因子的基因疗法之前耐受化受试者和/或基因疗法后在患者中管理FVIII抑制物形成。

[0267] 获得性血友病

[0268] 获得性血友病的特征为在以前正常凝血的个体中针对FVIII的自身抗体抑制物的存在。它是一种稀有的病患,其估计发病率为每百万人群中每年1-3例。与获得的自身抗体抑制物相关的死亡率接近25%,相比之下那些带有同种抗体的个体中的死亡风险实质性更低。

[0269] 与同种抗体抑制物患者相比,获得性血友病特点为:(1) 更为严重的出血模式;(2) 在老年人群中较高发病率;(3) 与可鉴定的潜在自身免疫疾病、淋巴增生性或实体瘤恶性、妊娠,和在大约50%的病例中使用某种抗生素例如青霉素和磺胺类一起发生;以及(4) 遵循II类药代动力学模式的体外抑制物活性及自身抗体对靶定凝血因子的不完全中和,这通常导致患者血浆中范围在2%-18%的剩余VIII因子水平。

[0270] 本发明的所述肽或组合物可以施用于获得性血友病患者,或认为由于例如下列各项而具有形成获得性血友病的风险的患者:

[0271] i) 用例如青霉素或磺胺类药迫切治疗;

[0272] ii) 肿瘤或其它恶性肿瘤的进展;

[0273] iii) 即将到来的或早期妊娠。

[0274] 本发明现在将进一步通过实施例的方式描述,这是为了用于协助本领域的普通技术人员实施本发明,而不是意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0275] 实施例1研究FVIII衍生肽的溶解度

[0276] 共测试了32种肽:其中16种基于FVIII肽PRCLTRYSSFVNME(“PRCLT”);16种肽基于FVIII肽DNIMVTFRNQASRPY(“DNIMV”)。所述肽总结于下面的表1和表2中。

[0277] 表1-PRCLT衍生肽

肽编号	序列	SEQ ID No.
1	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	1
2	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	2
3	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	3
4	Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	4
5	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	5
6	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-	6

[0279]

	Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	
7	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	7
8	Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	8
9	Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	9
10	Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	10
11	Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	11
12	Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	12
13	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys	13
14	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu	14
15	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys	15
16	Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Glu	16

[0280] 表2-DNIMV衍生肽

[0281]

肽编号	序列	SEQ ID No.
-----	----	------------

[0282]

17	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	17
18	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	18
19	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	19
20	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	20
21	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	21
22	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	22
23	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	23
24	Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	24
25	Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	25
26	Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	26
27	Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	27
28	Lys-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	28
29	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	29
30	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala	30

[0283]		-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	
	31	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala -Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	31
	32	Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala -Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Glu	32

[0284] 20mg/ml的每种检测肽的储液制备于DMSO中。对照肽(一种称为4Y的MBP衍生肽)的储液也制备于DMSO中。肽4Y具有序列Ac-ASQYRPSQR。其结构上与所述测试肽不同,但已知对于作为耐受化抗原的应用是足够可溶的。

[0285] 通过向96孔板中加水以得到浓度10、5、2.5和1.25mg/ml,制备40μl体积肽溶液的连续稀释。

[0286] 将所述板置于室温1小时,使允许任何沉淀物形成,然后在14800rpm离心10分钟来分离沉淀的/胶体的肽与真正溶解的溶质。

[0287] 将每个管中最上部的2μl样品取出用于分析。在280nm波长测量吸光度并计算浓度(mg/ml)。

[0288] 结果示于图1中。一些标记的肽证明与4Y相等的溶解度,甚至在高浓度时。编码为绿色的肽与对照肽4Y同样可溶,编码为红色的肽难溶,而编码为琥珀色的肽具有中间溶解度。

[0289] 实施例2将标记的肽以临床相关的浓度直接溶解于水性溶剂中

[0290] 对于每种测试肽以及亲本肽(PRCLT和DNIMV),以在DMSO(对照)或PBS中的4mg/ml制备两管。

[0291] 每个管在微型离心机中全速旋转5分钟。从每个溶液的上部取出10μl样品,并且记录每种肽的分子量和吸光系数。

[0292] 上清液的吸光度使用NanoDrop测量,并计算浓度。实际浓度和期望值4mg/ml相比,结果示于图2中。在这个图中,实际和期望浓度之间的较大差距对应较低的相对溶解度。

[0293] 如图2所述,标记肽SEQ ID No.1、2、9、10、17、18、25和26与亲本肽相比,在PBS中都具有改善的溶解度。

[0294] 实施例3-所述标记肽起apitopes的作用

[0295] 用亲本肽PRCLT或DNIMV引发HLA-DR2转基因小鼠。然后,收获脾和淋巴结,并在CD4纯化后,细胞使用1μg/ml人重组FVIII再刺激。与BW5147细胞融合后,扩增产生的克隆,并“筛选”针对DNIMV或PRCLT的特异性。这通过将杂交瘤细胞和5x10⁴DR-2阳性抗原呈递细胞(MGAR细胞系)和10μg/ml PRCLT/DNIMV或培养基孵育48小时来进行。然后,通过ELISA对上清液分析IL-2的产生。

[0296] 扩增与肽孵育时特异性产生IL-2的克隆并再次用FVIII(1μg/ml)筛选。

[0297] 响应FVIII和肽两者而产生IL-2的克隆接着用于评估修饰的DNIMV和PRCLT肽是否是apitopes,即它们是否能够结合MHC分子并被固定的和新鲜的APC呈递给T细胞。

[0298] 将5x10⁴个杂交瘤细胞与5x10⁴个新鲜的或固定的MGAR细胞、和10μg/ml肽、1μg/ml FVIII或培养基一起孵育48小时。然后,使用ELISA对上清液分析IL-2。PRCLT的结果示于图

3a, DNIMV的结果示于图3b。

[0299] 所有的标记肽都能够被固定的抗原呈递细胞呈递,指示它们与亲本肽PRCLT和DNIMV一样都是apitopes。

[0300] 实施例4:离体T细胞耐受性

[0301] 为了确定修饰的apitope是否能够调节对亲本肽的T细胞应答,雄性HLA-DR2转基因小鼠使用 $3 \times 100\mu\text{g}$ 肽(肽SEQ ID No.1,2,17或18)或PBS作为对照处理,接着使用完全弗氏佐剂中的亲本肽(PRCLT和DNIMV)各 $100\mu\text{g}$ 免疫。10天后,收集引流淋巴结和脾,并使用PRCLT或DNIMV在体外刺激。结果示于图4 (PRCLT) 和5 (DNIMV) 中。使用修饰肽SEQ ID No.1或SEQ ID No.2处理减轻了对PRCLT的T细胞应答,而使用修饰肽SEQ ID No.17或SEQ ID No.18处理减轻了对DNIMV的T细胞应答。因此,所述修饰肽能够减轻使用亲本肽免疫的小鼠的免疫反应。

[0302] 实施例5:离体T细胞耐受性

[0303] 为了确认修饰的apitope对调节T细胞对亲本肽的应答的影响是否延伸到调节对FVIII的应答,用 $3 \times 100\mu\text{g}$ 肽(肽SEQ ID No.1或SEQ ID No.17)处理雌性HLA-DR2转基因小鼠,接着使用完全弗氏佐剂中的亲本肽(PRCLT和DNIMV)各 $100\mu\text{g}$ 引发。10天后,收集引流淋巴结和脾,并使用PRCLT、DNIMV或重组FVIII在体外刺激。结果示于图6中。肽SEQ ID No.1显著($p < 0.01$)减轻了对PRCLT肽的T细胞应答。肽SEQ ID No.17显著($p < 0.02$)减轻了对DNIMV肽的T细胞应答。

[0304] 肽SEQ ID No.1调节对PRCLT的应答,而肽SEQ ID No.17调节对DNIMV的应答。使用个体肽,对FVIII的反应也有一些减轻,其是不显著的。为了增强所述肽对FVIII免疫反应的效力,在进一步的实验中使用修饰的DNIMV和修饰的PRCLT的联合。

[0305] 实施例6:用剂量递增的PRCLT和DNIMV修饰肽的联合进行抗体生成阻止

[0306] 遵循剂量递增方法处理使用肽SEQ ID No.1和肽SEQ ID No.17的联合处理雄性HLA-DR2转基因小鼠。以下述剂量给予所述联合的六次注射:0.1;1.0;10和 $3 \times 100\mu\text{g}$ (联合中的每种肽)。

[0307] 接着,动物每周用 $1\mu\text{g}$ 重组人FVIII引发,并使用肽SEQ ID No.1/SEQ ID No.17的联合(每种 $100\mu\text{g}$)同时治疗(rFVIII免疫3天后),从4次和8次FVIII免疫后(分别为第28天,图7a;第56天,图7b)取得的血液样品中分析抗FVIII抗体的生成。滴定血清,并通过直接ELISA分析。未免疫小鼠的抗体滴度在所有情况下都是阴性的,而认为抗FVIII抗体在处理鼠的血清中存在,其中结合率(使用阴性血清来计算比率)大于1.9。实验第28天和第56天的结果分别示于图7a和7b中。

[0308] 另外,在第56天测量了中和性FVIII抗体。FVIII中和性抗体使用显色法确定。简单的说,样品与 1IU/ml FVIII混合,通过加入FIX、FX、凝血酶、 CaCl_2 和磷脂质来起始凝血。孵育后,产生的FXa的量通过加入显色第五S-2760来确定,并测量OD信号。OD信号与样品中FVIII的活性成比例,并与含有已知量FVIII和无中和性抗体的样品相比。测试样品的%残留活性通过与对照样品相比计算,并以Bethesda样单位表示,并且示于图8中。使用肽SEQ ID 1和SEQ ID 17处理的小鼠与PBS处理的小鼠相比具有显著更低的中和性抗FVIII抗体水平。

[0309] 实施例7:使用剂量递增的PRCLT和DNIMV修饰肽的联合得到的离体T细胞耐受性

[0310] 遵循如实施例6所述的剂量递增方法对雄性/雌性DR2小鼠使用肽SEQ ID No.1/SEQ ID No.17的联合处理。

[0311] 用CFA中的100 μ g PRCLT和100 μ g DNIMV引发动动物。十天后分离引流淋巴结细胞和脾细胞,并在体外使用重组人FVIII再刺激。

[0312] 通过增殖试验评估T细胞应答(图9)。当小鼠使用SEQ ID No.1和SEQ ID No.17的联合处理时,在测试的所有浓度的FVIII中都看到了对FVIII的T细胞应答的显著减少。

[0313] 实施例8:在治疗性动物模型中,使用剂量递增的PRCLT和DNIMV修饰肽的联合抑制中和性抗体生成。

[0314] 用CFA中的3 μ g rFVIII引发HLA-DE2转基因小鼠,并在免疫三周后,遵循剂量递增方法处理使用肽SEQ ID No.1和肽SEQ ID No.17的联合处理。在下述剂量给予所述联合的六次注射:0.1;1.0;10和3x 100 μ g(联合中的每种肽)。使用相同的剂量递增方法使用无关FVIII DR2结合前列腺酸性磷酸酶(PAP)133-152肽(序列如描述于专利PCT/US2006/031961,SEQ ID No.15)处理对照动物。所有动物在rFVIII免疫后5周以及最后一轮肽治疗后4天接受IFA中的3 μ g rhFVIII的加强免疫。在第一次FVIII免疫后3周以及任何肽处理前,第5周(FVIII加强免疫前以及肽处理后)和随访期期间第7周、第9周和第13周采集的血浆样品中分析中和性抗体的生成。血浆样品中的中和性FVIII抗体水平如实施例6所述确定。

[0315] 图10中的结果显示了在FVIII免疫后3周(第3周)与对照肽处理相比,使用肽SEQ ID No.1和SEQ ID No.17处理在加强免疫后(第5周)显著抑制中和性抗体的形成。

[0316] 上述说明书中所提到的所有出版物通过提述并入本文。不脱离本发明的范围和精神,对本发明的方法和系统的各种修改和变化对于本领域的技术人员将是显而易见的。虽然本发明结合特定的优选实施方案描述,但应当理解本发明的权利要求不应不适当的受限于这些特定的实施方案。事实上,对于分子免疫学或相关领域的技术人员显而易见的对实施本发明的方式的各种修改也应在所附权利要求书的范围内。

[0317] SEQ ID No.33

[0318] 1 mqieltstcff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsd l gelpvdarfp prvpksfpfn

[0319] 61 tsvvykktlf veftdhlfn i akprppwmg l lgptiqaevy dtvvitlknm ashpvslhav

[0320] 121 gvsyw kaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh

[0321] 181 vdlvkdlng ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegksw hse tknslmqdrd

[0322] 241 aasarawpkm htvngyv nrs lpgligchrk svywhvigmg ttp evhsifl eghtflvrnh

[0323] 301 r qasleispi tfltaqtllm dlqqlfllch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlrmknne

[0324] 361 eaedydddl t dsemdvvrfd ddnspsfiqi rsvak khpkt wvhyiaae e dwdyaplvla

[0325] 421 pddrsyksqy lnngpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl

[0326] 481 liifknqasr pyniyp hgit dvrplysrrl pkgvkhkdf pilpgeifky kwtvtvedgp

[0327] 541 tksdprcltr yyssfvmr dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde

[0328] 601 nrswylteni qrflpn pagv qledpefqas nimhsingyv fdslqlsvcl hevaywyils

[0329] 661 igaqtdflsv ffsqytfkhk mvyedtl tlf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrnrg

[0330] 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknaieprs fsqn srhpst rqkqfnatti

[0331] 781 pendiektdp wfahrt pmpk iqnvsssdll mllrqsptph glslsdlqea kyetfsddps

[0332] 841 pgaidsnsl semthfrpql hhs gdmvftp esglqlrlne klgttaatel kkldfkvsst

[0333] 901 snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmpv hydsqlddttl fgkkssplte sggplslsee
[0334] 961 nndskllesg lmnsqesswg knvsstesgr lfkgkrahgp alltkdnalf kvsislktn
[0335] 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml
mdknatalrl
[0336] 1081 nhmsnktts knmemvqqkk egpippdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr
thgknslnsg
[0337] 1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nflseknkvv vgkgeftkdv glkemvfpss
rnlflltnldn
[0338] 1201 lhenntnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgtk nfmknflfls
trqnvegsyd
[0339] 1261 gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtkqiveky
acttrispnt
[0340] 1321 sqqnfvtqrs kralkqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst
ltqidyneke
[0341] 1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrsplpia kvssfpsirp iyltrvlfqd
nsshlpaasy
[0342] 1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailtle mtgdqrevgs lgtsatnsvt
ykkventvlp
[0343] 1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdldftets ngspghldlv egslldqteg
aikwneanrp
[0344] 1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta
fkkkdtlsl
[0345] 1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnpp vlkrhqreit
rttlqsdqee
[0346] 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm
sssphvlrnr
[0347] 1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni
mvtfrnqasr
[0348] 1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd
ckawayfsdv
[0349] 1861 dlekdvhs gl igpllvchtn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf
tenmerncra
[0350] 1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmaqdqrir wyllsmgsne
nihsihfsg
[0351] 1981 vftvrkkeey kmalynlypg vfetvemlps kagiwrvecl igehlhagms
tlflvysnkc
[0352] 2041 qtplgmasgh irdfqitasg qygqwapkla rlhysgsina wstkepfswi
kvdllapmii
[0353] 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd

ssgikhnifn

[0354] 2161 ppiiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit
assyftnmfa

[0355] 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvttqgvksl
ltsmyvkefl

[0356] 2281 isssqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvnsldeppl ltrylrihpq
swvhqialrm

[0357] 2341 evlgceaql y

序列表

<110> 艾匹托普国际股份有限公司

<120> 肽

<130> P046272PCT

<140> PCT/IB2013/060060

<141> 2013-11-11

<150> GB 1220328.7

<151> 2012-11-12

<150> GB 1316660.8

<151> 2013-09-19

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 1

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

[0001]

Met	Glu	Gly	Lys	Lys
			20	

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 2

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

Met	Glu	Gly	Lys	Glu
			20	

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 3

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

Met	Glu	Gly	Glu	Lys
-----	-----	-----	-----	-----

20

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 4

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

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 5

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

[0002]

Met Glu Gly Lys Lys
20

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 6

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

Met Glu Gly Lys Glu
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 7

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

Met Glu Gly Glu Lys

20

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 8

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

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 9

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

[0003] Met Glu Gly Lys Lys
20

<210> 10
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 10

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

Met Glu Gly Lys Glu
20

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 11

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

Met Glu Gly Glu Lys

20

<210> 12
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 12

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

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 13

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

[0004]

Met Glu Gly Lys Lys
20

<210> 14
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 14

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

Met Glu Gly Lys Glu
20

<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 15

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

Met Glu Gly Glu Lys

20

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 16

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

Met Glu Gly Glu Glu
20

<210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 17

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

[0005]

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 18

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 19

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

Pro Tyr Gly Glu Lys

20

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 20

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
20

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 21

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

[0006]

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 22

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 23

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

Pro Tyr Gly Glu Lys

20

<210> 24
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 24

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
20

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 25

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

[0007]

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 26

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 27

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

Pro Tyr Gly Glu Lys

20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 28

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
20

<210> 29
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 29

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

[0008]

Pro Tyr Gly Lys Lys
20

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 30

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

Pro Tyr Gly Lys Glu
20

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 31

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

Pro Tyr Gly Glu Lys

20

<210> 32
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 修饰的 FVIII 衍生肽序列

<400> 32

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

Pro Tyr Gly Glu Glu
 20

<210> 33
 <211> 2351
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 33

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

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

[0009]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

[0010]

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750

[0011]

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

[0012]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0013]

Leu 1040	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Pro 1045	Ser	Val	Trp	Gln	Asn 1050	Ile	Leu	Glu
Ser 1055	Asp	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys 1060	Val	Thr	Pro	Leu	Ile 1065	His	Asp	Arg
Met 1070	Leu	Met	Asp	Lys	Asn	Ala 1075	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu 1080	Asn	His	Met
Ser 1085	Asn	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser 1090	Lys	Asn	Met	Glu	Met 1095	Val	Gln	Gln
Lys 1100	Lys	Glu	Gly	Pro	Ile	Pro 1105	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn 1110	Pro	Asp	Met
Ser 1115	Phe	Phe	Lys	Met	Leu	Phe 1120	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala 1125	Arg	Trp	Ile
Gln 1130	Arg	Thr	His	Gly	Lys	Asn 1135	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly 1140	Gln	Gly	Pro
Ser 1145	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Ser 1150	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys 1155	Ser	Val	Glu
Gly 1160	Gln	Asn	Phe	Leu	Ser	Glu 1165	Lys	Asn	Lys	Val	Val 1170	Val	Gly	Lys
Gly 1175	Glu	Phe	Thr	Lys	Asp	Val 1180	Gly	Leu	Lys	Glu	Met 1185	Val	Phe	Pro
Ser 1190	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu 1195	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn 1200	Leu	His	Glu
Asn 1205	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu 1210	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu 1215	Glu	Ile	Glu
Lys 1220	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln 1225	Glu	Asn	Val	Val	Leu 1230	Pro	Gln	Ile
His 1235	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys 1240	Asn	Phe	Met	Lys	Asn 1245	Leu	Phe	Leu
Leu 1250	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val 1255	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp 1260	Gly	Ala	Tyr
Ala 1265	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe 1270	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp 1275	Ser	Thr	Asn
Arg 1280	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala 1285	His	Phe	Ser	Lys	Lys 1290	Gly	Glu	Glu
Glu 1295	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly 1300	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln 1305	Ile	Val	Glu

[0014]

Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg 1310	Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln 1320
Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser 1325	Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg 1335
Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu 1340	Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp 1350
Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser 1355	Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro 1365
Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp 1370	Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala 1380
Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser 1385	Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser 1395
Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser 1400	Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser 1410
Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro 1415	Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe 1425
Gln Asp Asn Ser Ser His Leu 1430	Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys 1440
Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser 1445	Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys 1455
Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala 1460	Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly 1470
Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser 1475	Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser 1485
Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu 1490	Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp 1500
Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys 1505	Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His 1515
Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe 1520	Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser 1530
Pro Gly His Leu Asp Leu Val 1535	Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr 1545
Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn 1550	Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val 1560
Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr 1565	Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser 1575

[0015]

Lys 1580	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala 1585	Trp	Asp	Asn	His	Tyr 1590	Gly	Thr	Gln
Ile 1595	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys 1600	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser 1605	Pro	Glu	Lys
Thr 1610	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp 1615	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu 1620	Asn	Ala	Cys
Glu 1625	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala 1630	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly 1635	Gln	Asn	Lys
Pro 1640	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp 1645	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg 1650	Thr	Glu	Arg
Leu 1655	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro 1660	Val	Leu	Lys	Arg	His 1665	Gln	Arg	Glu
Ile 1670	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln 1675	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu 1680	Ile	Asp	Tyr
Asp 1685	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu 1690	Met	Lys	Lys	Glu	Asp 1695	Phe	Asp	Ile
Tyr 1700	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln 1705	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe 1710	Gln	Lys	Lys
Thr 1715	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala 1720	Ala	Val	Glu	Arg	Leu 1725	Trp	Asp	Tyr
Gly 1730	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His 1735	Val	Leu	Arg	Asn	Arg 1740	Ala	Gln	Ser
Gly 1745	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys 1750	Lys	Val	Val	Phe	Gln 1755	Glu	Phe	Thr
Asp 1760	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro 1765	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu 1770	Leu	Asn	Glu
His 1775	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro 1780	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu 1785	Val	Glu	Asp
Asn 1790	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg 1795	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg 1800	Pro	Tyr	Ser
Phe 1805	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser 1810	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln 1815	Arg	Gln	Gly
Ala 1820	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe 1825	Val	Lys	Pro	Asn	Glu 1830	Thr	Lys	Thr
Tyr 1835	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His 1840	His	Met	Ala	Pro	Thr 1845	Lys	Asp	Glu

[0016]

Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
1850						1855					1860			
Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
1910						1915					1920			
Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His
1925						1930					1935			
Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met
1940						1945					1950			
Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
1955						1960					1965			
Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
1970						1975					1980			
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
2000						2005					2010			
Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
2015						2020					2025			
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
2030						2035					2040			
Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
2045						2050					2055			
Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
2060						2065					2070			
Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
2075						2080					2085			
Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile
2090						2095					2100			
Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
2105						2110					2115			

[0017]

Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
2120						2125					2130			
Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn
2135						2140					2145			
Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
2150						2155					2160			
Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
2165						2170					2175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Trp	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
2180						2185					2190			
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln
2195						2200					2205			
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser
2210						2215					2220			
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp
2225						2230					2235			
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe
2240						2245					2250			
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys
2255						2260					2265			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
2270						2275					2280			
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
2285						2290					2295			
Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val
2300						2305					2310			
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His
2315						2320					2325			
Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu
2330						2335					2340			
Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr							
2345						2350								
<210>	34													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人													
<400>	34													
Asp	Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr

	1	5	10	15
	<210> 35			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人			
	<400> 35			
	Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu			
	1 5 10 15			
	<210> 36			
	<211> 5			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 肽			
	<400> 36			
	Pro Arg Cys Leu Thr			
	1 5			
	<210> 37			
	<211> 5			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 肽			
[0018]	<400> 37			
	Asp Asn Ile Met Val			
	1 5			
	<210> 38			
	<211> 21			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 修饰的 FVIII 衍生肽通式			
	<220>			
	<221> MISC_FEATURE			
	<222> (1)..(2)			
	<223> Xaa 可以是 Lys 或 Glu			
	<220>			
	<221> MISC_FEATURE			
	<222> (20)..(21)			
	<223> Xaa 可以是 Lys 或 Glu			
	<400> 38			
	Xaa Xaa Gly Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg			
	1 5 10 15			
	Pro Tyr Gly Xaa Xaa			
	20			
	<210> 39			

<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 FVIII 衍生肽通式

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa 可以是 Lys 或 Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(21)
<223> Xaa 可以是 Lys 或 Glu

<400> 39

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

[0019]

Met Glu Gly Xaa Xaa
20

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 对照肽 4Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N-端乙酰化

<400> 40

Ala Ser Gln Tyr Arg Pro Ser Gln Arg
1 5

	PRCLT	DNIMV	
KK-KK	1	17	进一步调查
KK-KE	2	18	
KK-EK	3	19	
KK-EE	4	20	
EE-KK	5	21	进一步调查
EE-KE	6	22	
EE-EK	7	23	
EE-EE	8	24	
KE-KK	9	25	进一步调查
KE-KE	10	26	
KE-EK	11	27	
KE-EE	12	28	
EK-KK	13	29	
EK-KE	14	30	
EK-EK	15	31	
EK-EE	16	32	

图1

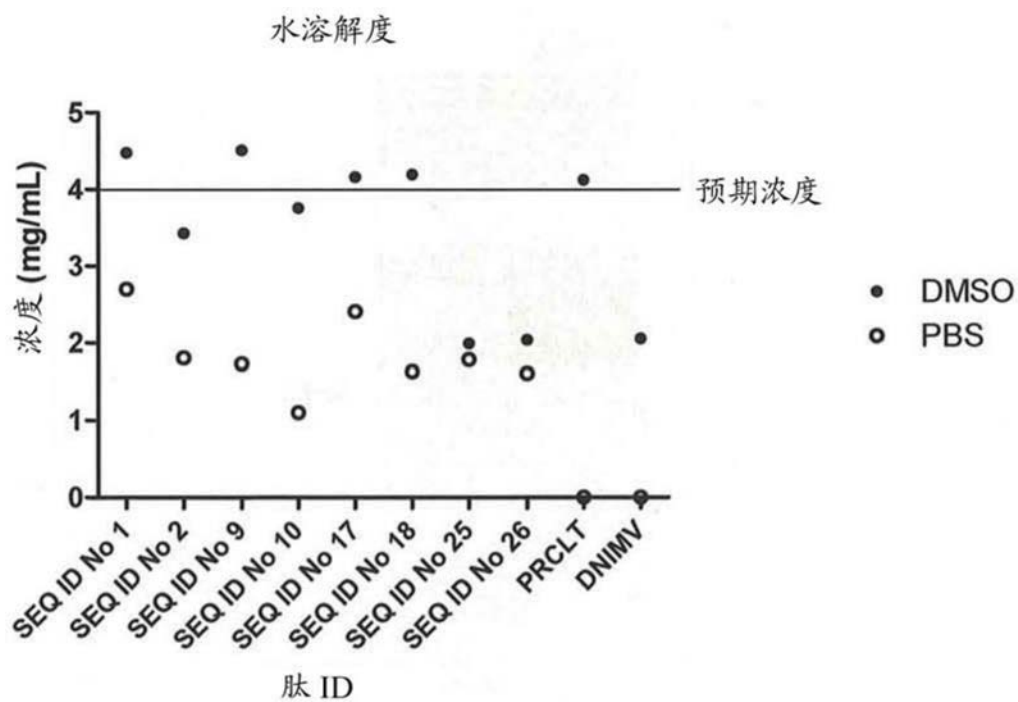


图2

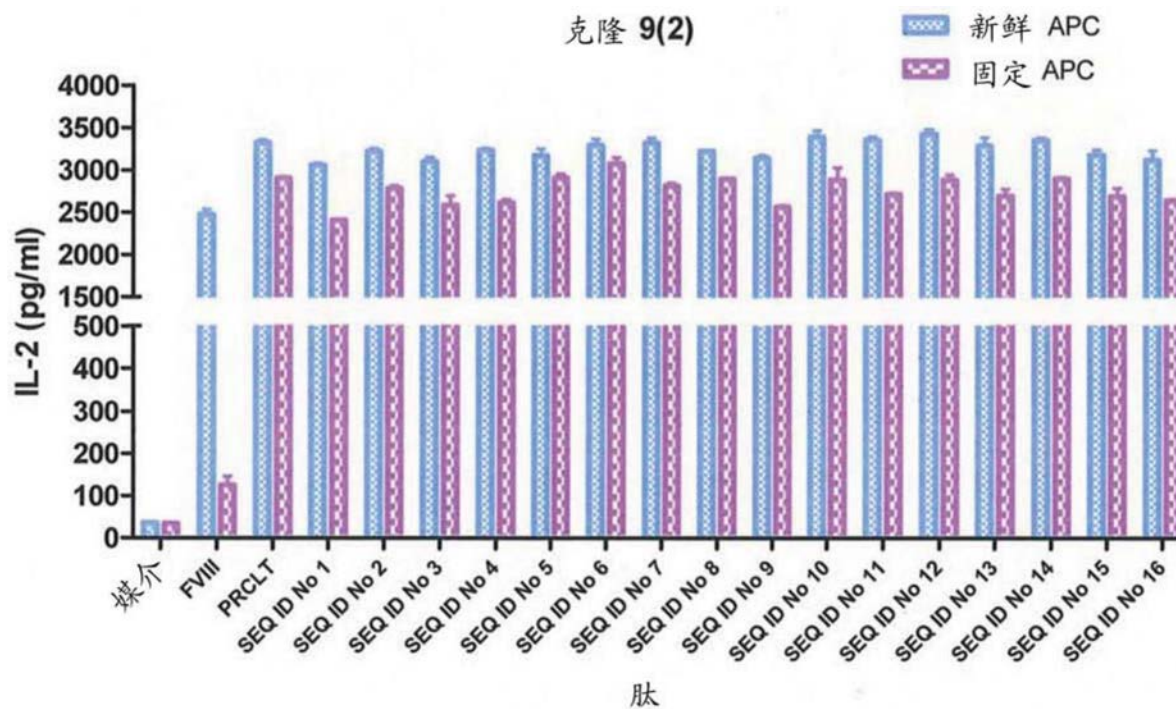


图3a

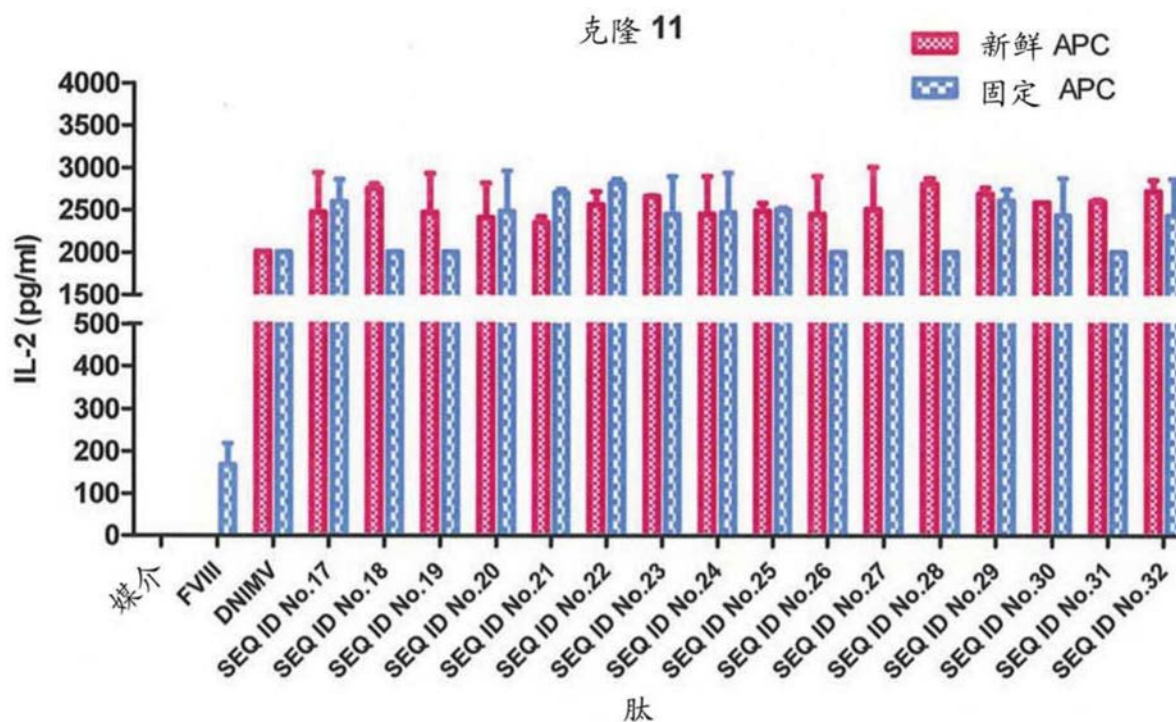


图3b

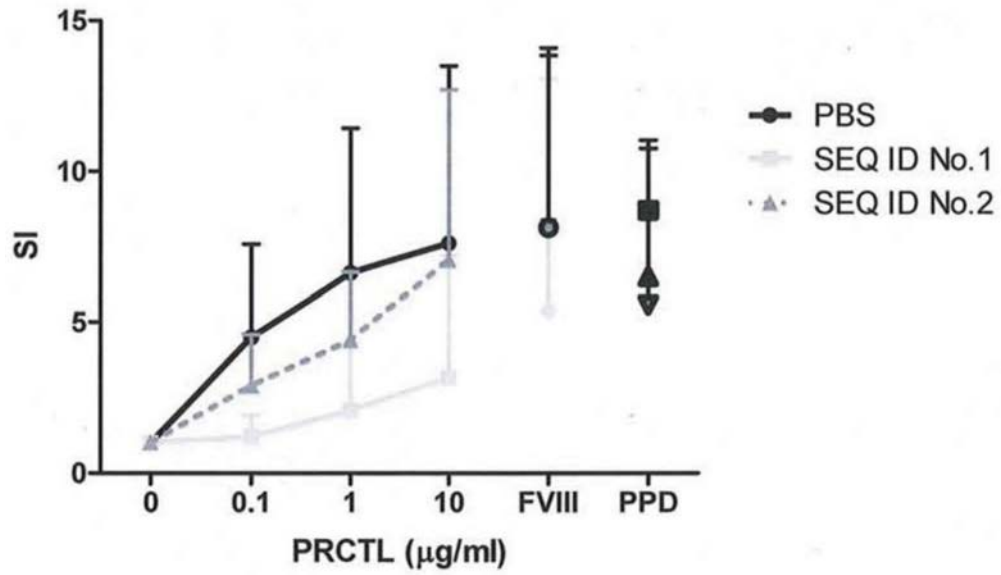


图4

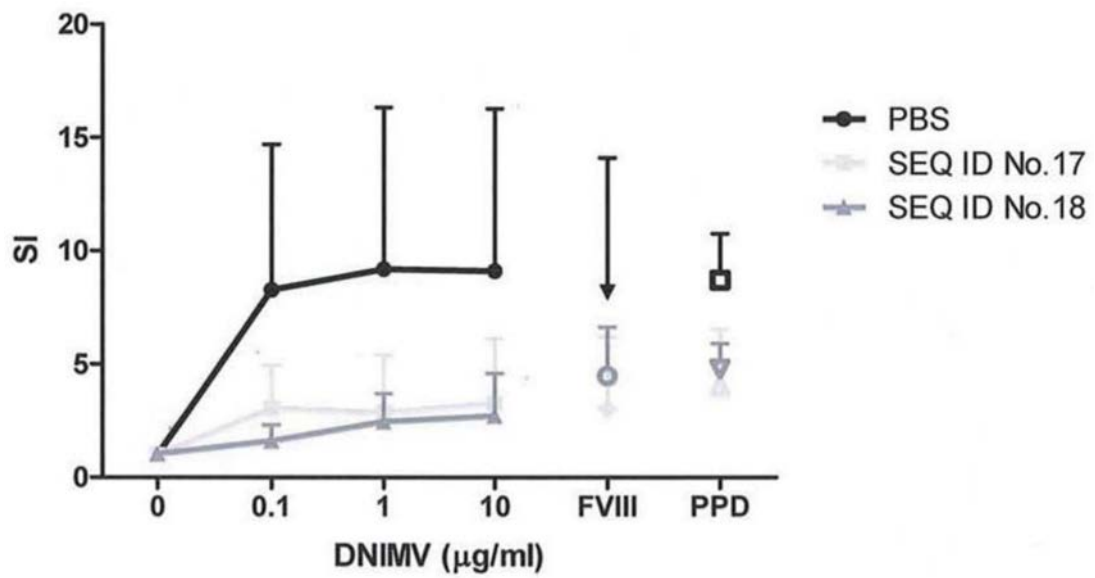


图5

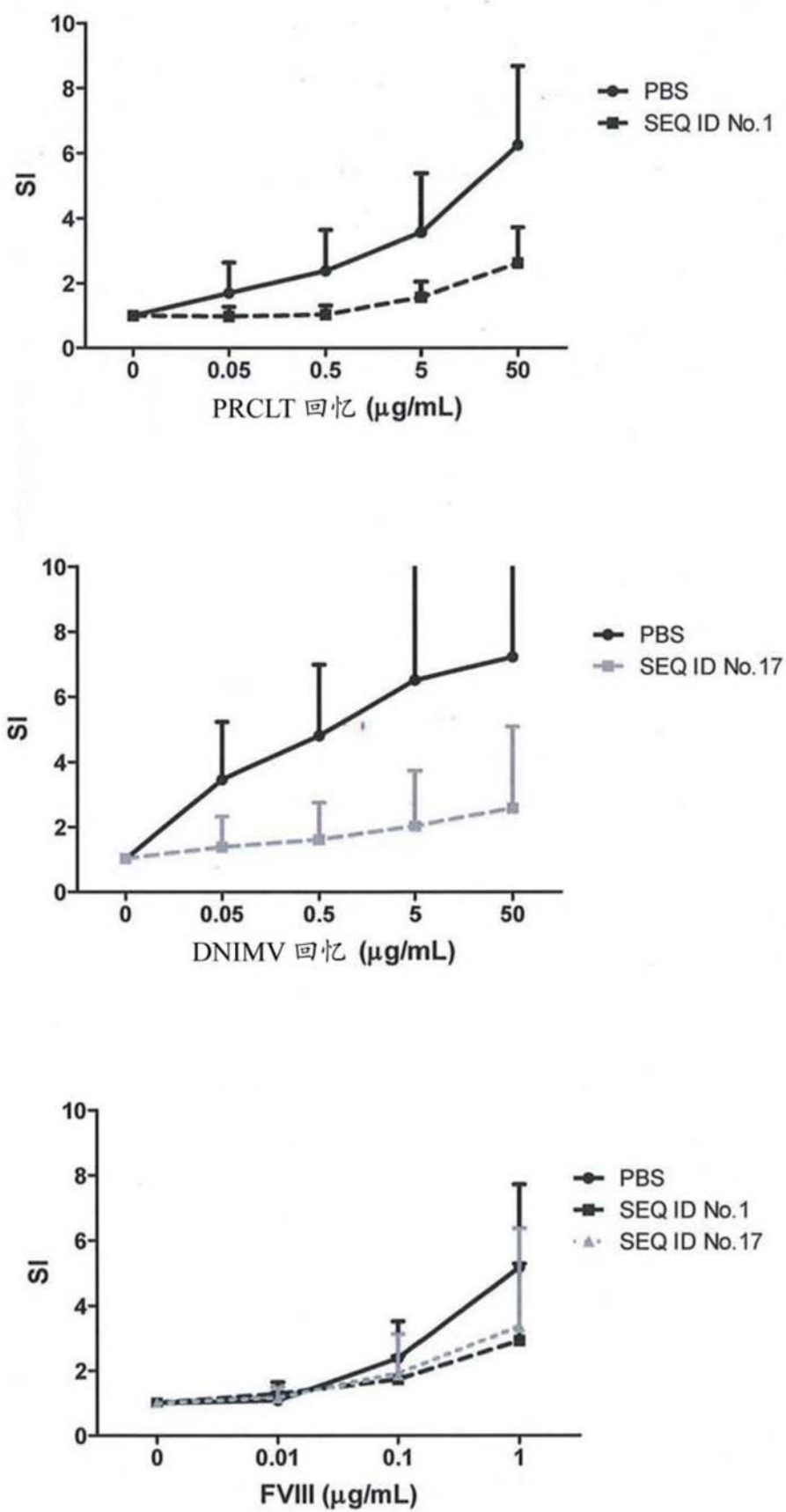


图6

第 28 天抗 FVIII 抗体滴度

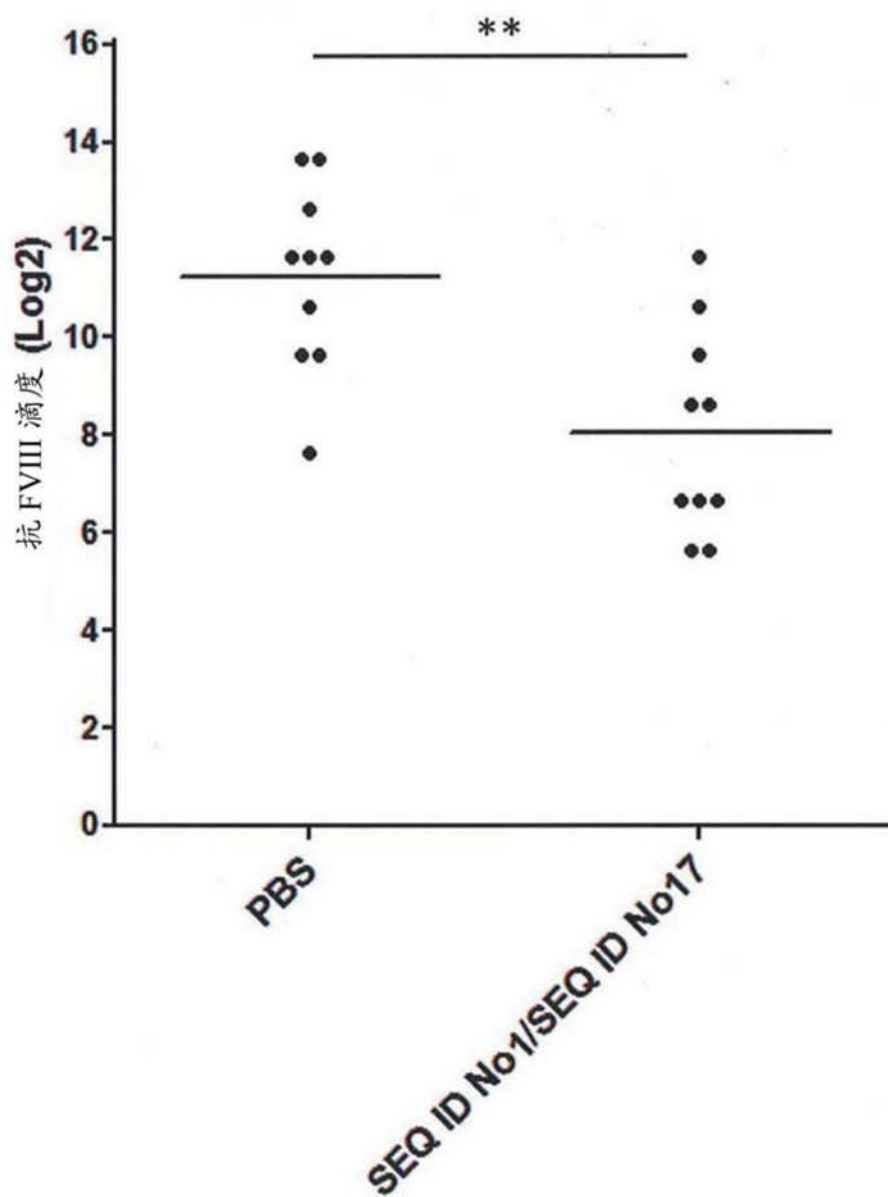


图7a

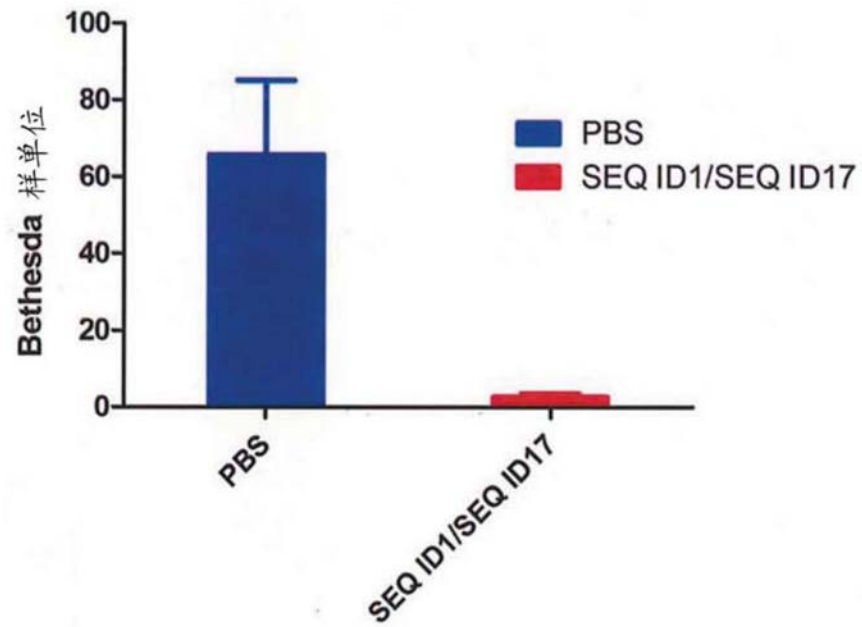


图8

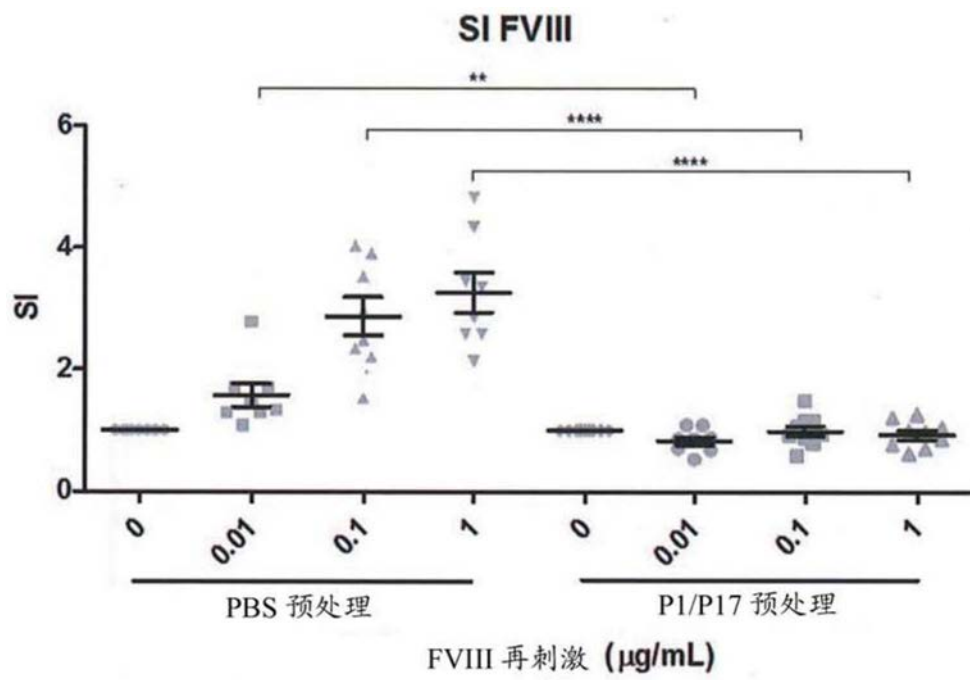


图9

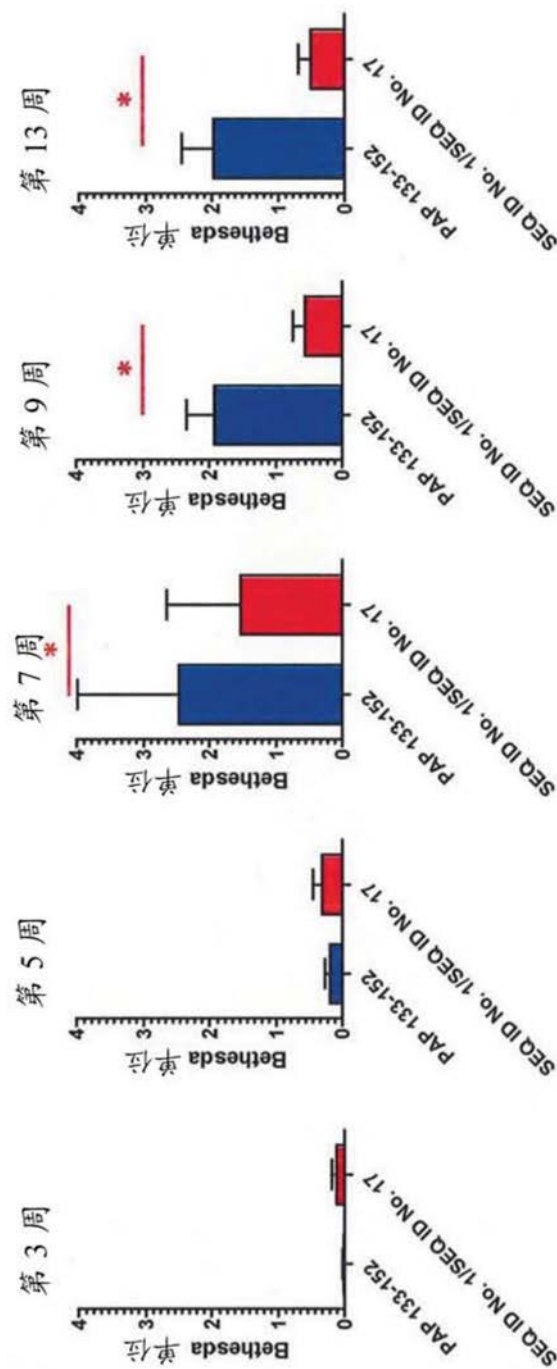


图10