República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015010625-0 B1

(22) Data do Depósito: 11/11/2013

(45) Data de Concessão: 07/03/2023

(54) Título: PEPTÍDEOS

(51) Int.Cl.: C07K 14/755; A61K 38/00; A61K 39/00; A61K 38/37.

(30) Prioridade Unionista: 12/11/2012 GB 1220328.7; 19/09/2013 GB 1316660.8.

(73) Titular(es): APITOPE INTERNATIONAL NV.

(72) Inventor(es): DAVID WRAITH; HEATHER STREETER.

(86) Pedido PCT: PCT IB2013060060 de 11/11/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/072958 de 15/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/05/2015

(57) Resumo: PEPTÍDEOS. A presente invenção se refere a peptídeos parcialmente deriváveis do FVIII que são capazes de se ligar a uma molécula MHC de classe II sem processamento adicional de antígeno e serem reconhecidos por um fator VIII específicos de células T. Em particular, a presente invenção se refere a peptídeos que compreendem a sequência DNIMVTFRNQASRPY ou PRCLTRYYSSFVNME com modificações na extremidade N e C-terminais. A presente invenção também se relaciona com a utilização de tal peptídeo para a prevenção ou supressão de formação de anticorpo inibidor na hemofilia A e / ou hemofilia adquirida.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção para: **“PEPTÍDEOS”.**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção se refere a peptídeos, pelo menos, parte do qual pode ser derivado a partir do fator VIII (FVIII). Os peptídeos podem ser utilizados para reduzir ou prevenir a formação de anticorpos inibidores do fator VIII, por exemplo, no tratamento de hemofilia A e hemofilia adquirida.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

HEMOFILIA

[0002] A hemofilia pertence a um grupo de doenças hereditárias do sangue que inclui hemofilia A, hemofilia B (doença de Christmas) e a doença de Von Willebrand.

[0003] Na hemofilia, a capacidade do sangue para coagular está severamente reduzida, porque um fator de coagulação essencial é parcialmente ou completamente ausente, resultando em aumento do tempo de sangramento.

[0004] A hemofilia A é uma deficiência do fator de coagulação VIII, enquanto a hemofilia B é uma deficiência do fator de coagulação IX. Em ambas as doenças, o gene defeituoso é encontrado no cromossoma X, de modo que as condições são ligadas ao X. A hemofilia A é cinco vezes mais comum do que a hemofilia B.

[0005] A hemofilia é uma condição genética hereditária ao longo da vida, que afeta mulheres como transportadoras e machos que herdam a doença. Cerca de um terço dos novos diagnósticos são onde não há história familiar anterior. Aparece em todo o mundo e ocorre em todos os grupos raciais. Cerca de 6.000 pessoas são afetadas com hemofilia no Reino Unido.

[0006] Hemofílicos sangram por um período prolongado após a lesão. Ferimentos externos, tais como cortes e arranhões não costumam causar problemas graves: muitas vezes é possível parar o sangramento aplicando um grau de pressão e cobrindo a área afetada (por exemplo, com um emplastro).

[0007] O principal problema é a hemorragia interna em articulações, músculos e tecidos moles, que podem ocorrer espontaneamente. O sangramento interno, como hemorragias no cérebro, é muito difícil de gerir e pode ser fatal. Hemorragias repetidas nas articulações provocam dor aguda e pode causar artrite e / ou dano articular a longo prazo levando a deficiência.

[0008] O tratamento para a hemofilia é geralmente por substituição do fator de coagulação em falta. Na hemofilia leve ou moderada injeções podem ser dadas no momento que ocorre um sangramento (terapia *on-demand*). No entanto, na hemofilia A grave, injeções profiláticas regulares são dadas

para ajudar o sangue a coagular e minimizar a probabilidade de lesões articulares a longo prazo.

[0009] Uma complicação potencialmente grave da terapia de substituição do fator de coagulação para hemofilia A é o desenvolvimento de anticorpos que neutralizam a função pró-coagulante do fator VIII. Inibidores do Fator VIII ocorrem em aproximadamente 25% dos indivíduos com hemofilia A grave. Uma vez que os doentes com hemofilia A pode ser congênitos geneticamente deficiente em FVIII, a síntese de inibidores é uma resposta aloimune para a proteína estranha administrada para prevenir ou tratar episódios hemorrágicos.

[00010] As células T CD4+ desempenham um papel central na resposta imune ao FVIII. Depois de ter sido absorvida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), FVIII sofre degradação proteolítica em fragmentos peptídicos (Reding et ai (2006) Hemofilia 12 (supp 6) 30-36). Estes peptídeos são então apresentados sobre a superfície da APC em associação com molécélulas MHC de classe II. Este complexo é então reconhecido pelo receptor de células T de uma célula T CD4 + específica para o FVIII. Na presença de sinais co-estimuladores apropriados, em última análise, este faz com que o reconhecimento de células CD4 + a dirigir a síntese de anticorpos por células B.

[00011] A incidência de formação de inibidor aumenta

inicialmente com o número de tratamentos de fator VIII, mas parece plateau após 50-100 dias de exposição. A formação de inibidores é muito mais comum na hemofilia grave do que na doença leve ou moderada e alguns defeitos moleculares, mais claramente grandes deleções e mutações nonsense na cadeia leve do fator VIII, parecem predispor à formação do inibidor. Parâmetros tais como a concentração, tipo (purificado ou recombinante) de fator de substituição, e histórico de tratamento também pode afetar a probabilidade de produção de anticorpos.

[00012] A gestão de doentes hemofílicos com inibidores é um desafio contínuo. Indução de tolerância imunológica (ITI), utilizando uma técnica de dessensibilização é bem-sucedida em alguns pacientes com aloanticorpos contra o fator VIII. Esta abordagem terapêutica exige a exposição contínua à terapia de reposição de fator, por isso é uma estratégia a longo prazo.

[00013] Embora ITI possa ser bem-sucedida, uma proporção significativa (cerca de 30%) dos pacientes não responde ao ITI. Os pacientes com elevados títulos de inibidor são muito menos propensos de responder ao tratamento. Outro fator que contribui significativa é a idade no início do início ITI, com diminuiu consideravelmente as taxas de sucesso quando o paciente tem mais de 20 anos (Hay

et al (2005) Seminars in Trombose e Hemostasia 32: 15-21)

[00014] Quando a terapia ITI não tiver sucesso, o inibidor geralmente persiste por toda a vida, e como tais pacientes são geralmente alto-respondedores, é necessário no tratamento de episódios de sangramento com medicamentos com FVIII ignorando, como ativados concentrados protrombina complexos (FEIBA ™) e recombinant- ativado FVII. No entanto, a utilização de tais agentes é associada a eventos adversos, tais como a coagulação intravascular disseminada, enfarte agudo do miocárdio, embolia pulmonar e trombose (Acharya e DiMichele (2006) Melhor Prática & Investigação Clínica Hematologia 19:51 -66).

[00015] A terapia imunossupressora é por vezes utilizada para pacientes que não conseguem resposta ao ITI. O tratamento inclui a administração de drogas imunossupressoras, tais como a ciclofosfamida, a prednisona, azatioprina, e ciclosporina, as quais não têm como alvo especificamente o sistema imune. Estes tratamentos podem ter efeitos colaterais associados com a imunossupressão geral.

[00016] Há um interesse renovado na depleção de células B seletiva utilizando Rituximab™, um anticorpo monoclonal humanizado para o antígeno CD20 de células B. No entanto, reações à infusão, doença do soro e infecções oportunistas ocorreram em algumas crianças tratadas com esta

droga (DiMichele (2007) J Thromb Haemost 5: 143-50).

HEMOFILIA ADQUIRIDA

[00017] Hemofilia adquirida é uma condição auto-imune rara que afeta entre 1 e 4 pessoas em cada milhão. Nesta condição, os indivíduos que não estão carregados com hemofilia desenvolvem anticorpos contra um dos fatores de coagulação, tais como o fator VIII. Pensa-se que as doenças auto-imunes e da gravidez, tais como artrite reumatóide e câncer podem aumentar o risco de desenvolvimento de hemofilia adquirida. Embora existam diferenças nos mecanismos imunes subjacentes que levam a sua produção, as manifestações clínicas de inibidores de FVIII produzidos em resposta à terapia de substituição fator de coagulação e às produzidas na hemofilia adquirida são semelhantes.

[00018] Doentes hemofílicos adquiridos têm uma taxa de mortalidade que se aproxima de 25%, em parte por causa da associação de inibidores adquiridos com complicações hemorrágicas graves. A terapia de inibidores de auto-anticorpos adquiridos é baseada principalmente na necessidade de controlar ou prevenir complicações hemorrágicas graves, que frequentemente são a vida eo membro ameaçando e, secundariamente, para erradicar a auto-anticorpos para restaurar a coagulação normal.

[00019] Alguns sangramentos associados com auto-

anticorpos inibidores de baixo título (<5 Unidades Bethesda) pode ser tratado eficazmente com concentrados de FVIII administrado em doses elevadas. Concentrado de FVIII Porcina antigamente era considerado uma terapia de primeira linha crítica para o sangramento decorrente da hemofilia adquirida, uma vez que era a única terapia de reposição que proporcionou a oportunidade de realmente medir os níveis de atividade de coagulação FVIII pós-infusão no laboratório. O produto foi retirado do mercado em 2004 por causa da contaminação dos grupos de plasma de suíno por parvovírus suíno. Agora, os agentes "ignorando" são mais comumente usados, mas existem riscos potenciais de trombogenicidade e há apenas cerca de 80% de eficácia para cada produto. Troca de plasma via plasmaférese e immunoadsorption extracorpórea pode ser necessária para reduzir temporariamente a título de inibidor suficiente para agentes ou substituição de FVIII ignorando a fornecer hemostasia adequada.

[00020] Erradicação de inibidores de auto-anticorpos depende de medidas imunossupressoras, tais como: (1) a administração de corticosteróides com 30% de eficácia -50% em 3-6 semanas; (2) utilização de agentes citotóxicos e agentes quimioterapêuticos mielossupressores, por exemplo, ciclofosfamida, ciclosporina, 2-clorodesoxiadenosina; (3) imunomodulação com imunoglobulina intravenosa; e (4) a

depleção de linfócitos B selectiva com rituximab. Respondedores rituximab™ pode exigir o uso concomitante de esteróides e recaídas podem responder ao re-tratamento.

[00021] Assim, todos os métodos atualmente disponíveis para a redução da produção de aloanticorpo associada com hemofilia A tratamento e produção de auto-anticorpos em hemofilia adquirida, têm deficiências. Existe, portanto, uma necessidade de métodos melhorados para resolver o problema de anticorpos anti-FVIII na hemofilia A e na hemofilia adquirida.

[00022] Os presentes inventores verificaram que é possível evitar a formação de anticorpos inibidores de FVIII por pré-criar tolerï¿½cia do paciente com os peptídeos derivados de FVIII e para tratar doenças como a hemofilia por administração de peptídeos derivados do FVIII, a fim de reduzir os anticorpos inibidores do FVIII.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00023] O primeiro aspecto da presente invenção, portanto, refere-se a um peptídeo, pelo menos uma parte da sequência do qual é derivável a partir do FVIII, que é capaz de induzir ou de restaurar a tolerância do FVIII.

[00024] Em uma primeira concretização do primeiro aspecto da invenção, a invenção proporciona um peptídeo que compreende a sequência derivada do FVIII DNIMVTFRNQASRPY, a

qual tem uma das seguintes sequências:

[00025] 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)

[00026] 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)

[00027] 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)

[00028] 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)

[00029] 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)

[00030] 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)

[00031] 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)

[00032] Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu (SEQ ID No. 30) and

[00033] 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).

[00034] Em uma segunda concretização, a presente invenção proporciona um peptídeo que compreende a sequência derivada PRCLTRYYSSFVNME-FVIII que tem uma das seguintes sequências:

[00035] 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)

[00036] 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)

[00037] 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)

[00038] 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)

[00039] 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)

[00040] 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)

[00041] 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)

[00042] 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) e

[00043] 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).

[00044] Num segundo aspecto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende uma pluralidade de peptídeos, incluindo um ou mais peptídeo (s) de acordo com o primeiro aspecto da invenção.

[00045] A composição pode compreender pelo menos um peptídeo, de acordo com a primeira concretização e pelo menos um peptídeo, de acordo com a segunda concretização do

primeiro aspecto da invenção.

[00046] A composição pode compreender um peptídeo que possui a SEQ ID N° 1 e um peptídeo que possui a SEQ ID N° 17.

[00047] A composição pode estar na forma de um kit, em que a pluralidade de peptídeos é fornecida separadamente para administração separada, subsequente, sequencial ou simultânea.

[00048] O peptídeo ou uma composição da invenção pode ser para utilização na supressão, reduzir, ou prevenir o desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII.

[00049] A presente invenção também proporciona a utilização de um tal peptídeo ou composição, no fabrico de um medicamento para suprimir, reduzir ou prevenir o desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII.

[00050] A presente invenção também fornece um método para suprimir, prevenir ou reduzir o desenvolvimento de anticorpos inibidores do Fator VIII em um sujeito, que compreende o passo de administração de um tal peptídeo ou composição ao sujeito.

[00051] O sujeito pode ser deficiente em FVIII. Em particular, o sujeito pode ter a hemofilia A, e pode ser, ou ser de cerca de, submetidos a terapia de substituição do fator VIII.

[00052] Em alternativa, o sujeito pode ter, ou estar

em risco de contrair, hemofilia adquirida.

[00053] Inibidores do fator VIII são encontrados com mais freqüência em indivíduos que expressam HLA-DR2. O sujeito tratado pelo método da invenção pode, portanto, ser positiva de HLA-DR2.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00054] Figura 1: Solubilidade de peptídeos FVIII modificados

[00055] Um total de 32 peptídeos testados foram: 16 dos quais foram baseadas no peptídeo de FVIII PRCLTRYYSSFVNME ("PRCLT") (SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13); e 16 dos quais foram baseadas no peptídeo de FVIII DNIMVTFRNQASRPY ("DNIMV") (SEQ ID No. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). A sua solubilidade foi testada em relação a um peptídeo controle não relacionado (4Y), que é conhecido por ser suficientemente solúvel para ser aplicada a um antígeno criar tolerância. No diagrama, o verde representa um peptídeo que é pelo menos tão solúvel como 4Y, laranja representa um peptídeo, que não é tão solúvel como 4Y, mas é relativamente estreita, e vermelho representa um peptídeo, que não é tão solúvel como 4Y. Peptídeos codificados verde eram tão solúvel como peptídeo de controle 4Y, peptídeos codificados vermelho eram pouco solúvel, e um peptídeo âmbar codificada tinha solubilidade

intermédia.

[00056] Figura 2: Solubilidade de peptídeos marcados em solução aquosa.

[00057] A concentração do peptídeo na solução seguinte dissolução em DMSO (controle) ou PBS foi determinada espectrofotometricamente e comparada com o valor esperado de 4 mg / ml_. A maior disparidade entre a concentração real e esperada corresponde à menor solubilidade relativa.

[00058] Figura 3: Os peptídeos marcados atuam como apitopos

[00059] Os ensaios de apresentação de antígenos com antígeno frescos e fixos apresentam células foram realizados para investigar se os peptídeos marcados, tal como os peptídeos e DNIMV PRCLT-mãe, são capazes de se ligar a uma molécula MHC e ser apresentado a uma célula T, sem processamento do antígeno, (a) PRCLT peptídeos; peptídeos (b) DNIMV.

[00060] Figura 4: Os peptídeos possuindo SEQ ID 1 e SEQ ID 2 regulam uma resposta de células T a PRCLT

[00061] A figura mostra recordar respostas de camundongos transgénicos HLA-DR2 tratados ou com SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou controle (PBS) e preparado com PRCLT. Os índices de estimulação de células T são mostrados através de uma faixa de concentrações de peptídeo e contra FVIII eo PPD

controle

[00062] Figura 5: Os peptídeos possuindo a SEQ ID 17 e SEQ ID 18 regular uma resposta de células T a DNIMV.

[00063] A figura mostra registro de respostas de camundongos transgênicos HLA-DR2 tratados com qualquer das SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 ou controle (PBS) e preparado com DNIMV. Índices de estimulação de célula T são mostrados através de uma gama de concentrações de peptídeos e contra o FVIII e a PPD de controle.

[00064] Figura 6: Os peptídeos possuindo SEQ ID 1 e SEQ ID 17 regular uma resposta de células T às seus peptídeos parentais.

[00065] A figura mostra recordar respostas de camundongos transgénicos HLA-DR2 tratados com qualquer das SEQ ID 1 ou SEQ ID 17 ou controle (PBS) e preparado com PRCLT e DNIMV e recordar in vitro com PRCLT, DNIMV ou FVIII. T índices de estimulação celular são mostrados através de uma gama de concentrações de peptídeo e contra FVIII. Há uma inibição significativa das respostas de células T aos peptídeos parentais.

[00066] Figura 7: Uma combinação de um peptídeo que possui a SEQ ID N° 1 e um peptídeo possuindo SEQ ID NO: 17 inibe a produção de anticorpo anti-FVIII in vivo.

[00067] A figura mostra ponto final títulos de

anticorpos anti-FVIII de camundongos tratados com uma combinação de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID 17 (ou controle de PBS) e imunizados com 8 imunizações semanais FVIII

[00068] Figura 7a: resultados em dia28

[00069] Figura 7b: resultados em day56

[00070] FIGURA 8: Uma combinação de um peptídeo que possui a SEQ ID N ° 1 e um peptídeo que possui a SEQ ID N ° 17 impede a produção de anticorpos neutralizantes anti-FVIII in vivo, após a exposição de FVIII

[00071] A figura mostra os níveis de anticorpos neutralizantes anti-FVIII em camundongos tratados com a combinação de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID 17 (ou controle de PBS), antes e durante 8 imunizações semanais de FVIII. No day56 há uma redução significativa de anticorpos neutralizantes em camundongos tratados com peptídicas.

[00072] Figura 9: Uma combinação de um peptídeo que possui a SEQ ID N ° 1 e um peptídeo possuindo SEQ ID NO: 17 inibe as respostas de células T para o FVIII.

[00073] A figura mostra recordar respostas de camundongos transgénicos HLA-DR2 tratados com uma combinação de SEQ ID NO: 1 e, SEQ ID 17 ou controle (PBS) e activadas com DNIMV e PRCLT. T índices de estimulação celular são mostrados através de uma gama de concentrações de FVIII.

[00074] FIGURA 10: Uma combinação de um peptídeo que

possui a SEQ ID N ° 1 e um peptídeo que possui a SEQ ID N ° 17 suprime neutralizantes geração de anticorpos anti-FVIII em um modelo animal terapêutico com uma resposta imunitária em curso de FVIII

[00075] A figura mostra os níveis de anticorpos neutralizantes anti-FVIII em camundongos tratados com a combinação de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID 17 ou fosfatase ácida prostática (PAP) 133-152 peptídeo de controle (sequência como descrito em PCT/US2006/031961, SEQ ID No. 15) após uma produção de FVIII resposta imune e anticorpo anti-FVIII foi induzida. Os camundongos receberam tratamento peptídeo três semanas após a imunização e antes de rFVIII de um impulso de imunização com rFVIII. Duas semanas após a vacinação de reforço de FVIII (Semana 7), há uma redução significativa de anticorpos neutralizantes anti-FVIII em camundongos tratados com peptídicas que é mantida durante o curso da experiência durante até 13 semanas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

PEPTÍDEO

[00076] A presente invenção se refere a um peptídeo.

[00077] O termo "peptídeo" é utilizado no sentido normal para significar uma série de resíduos, tipicamente, L-aminoácidos, ligados uns aos outros tipicamente através de ligações peptídicas entre os grupos a-amino e carboxilo de

aminoácidos adjacentes. O termo inclui peptídeos modificados e análogos de peptídeos sintéticos.

[00078] O peptídeo da presente invenção pode ser produzidos utilizando métodos químicos (Peptide Chemistry, A Textbook prático. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlim.). Por exemplo, os peptídeos podem ser sintetizados por técnicas de fase sólida (Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204), clivado a partir da resina, e purificados por cromatografia líquida preparativa de elevado desempenho (por exemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, Nova Iorque NY). A síntese automatizada pode ser conseguida, por exemplo, utilizando o ABI 43 1 Um sintetizador de peptídeos (Perkin Elmer) em conformidade com as instruções fornecidas pelo fabricante.

[00079] O peptídeo pode, alternativamente, ser feito por meios recombinantes, ou por clivagem de um peptídeo a partir do fator VIII, seguido por uma modificação de uma ou ambas as extremidades. A composição de um peptídeo pode ser confirmada por análise de aminoácido ou sequenciamento (por exemplo, o procedimento de degradação de Edman).

[00080] Para fins práticos, há várias outras características que o peptídeo pode mostrar. Por exemplo, é importante que o peptídeo seja suficientemente estável *in vivo* para ser terapeuticamente útil. A meia-vida do peptídeo

in vivo pode ser, pelo menos, 10 minutos, 30 minutos, 4 horas ou 24 horas.

[00081] O peptídeo também pode demonstrar boa biodisponibilidade *in vivo*. O peptídeo pode manter uma conformação *in vivo* que lhe permita ligar-se a uma molécula MHC na superfície da célula, devido a sem impedimento.

APÍTOPOS

[00082] Em uma resposta imune adaptativa, os linfócitos T são capazes de reconhecer epítopos internos de um antígeno de proteínas. As células apresentadoras de antígeno (APC) ocupam antígenos proteicos e degradam-los em fragmentos peptídicos curtos. Um peptídeo pode ligar-se a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II molécula dentro da célula e ser transportada para a superfície da célula. Quando apresentado na superfie celular, em conjunto com uma molécula do MHC, o ptido pode ser reconhecido por uma célula T (através do receptor de células T (TCR)), caso em que o peptídeo é um epítopo de células T.

[00083] Um epítopo é, portanto, um peptídeo derivável de um antígeno que é capaz de se ligar ao sulco de ligação ao peptídeo de MHC de classe I ou II molécula e ser reconhecida por uma célula T.

[00084] O epítopo mínimo é o fragmento mais curto derivável de um epítopo, que é capaz de se ligar ao sulco de

ligação ao peptídeo de uma classe I ou II do MHC molécula e ser reconhecido por uma célula T. Para uma dada região imunogénica, que é tipicamente possível gerar um "conjunto aninhado" de peptídeos que se sobrepõem, que agem como epítopos, os quais contêm o epítopo mínimo, mas que diferem nas suas regiões flanqueadoras.

[00085] Do mesmo modo, é possível identificar o epítopo mínimo para uma molécula de MHC nomeadamente: a combinação de células T medindo a resposta a ptidos truncados. Por exemplo, se uma resposta é obtida com o peptídeo compreendendo os resíduos 1-15 na biblioteca de sobreposição, conjuntos que são truncados em ambas as extremidades (ou seja, 1-14, 1-13, 1-12 etc., e 2-15, 3-15, 4-15, etc.) pode ser usada para identificar o epítopo mínimo.

[00086] Os presentes inventores determinaram previamente que existe uma ligação entre a capacidade de um peptídeo se ligar a um MHC de classe I ou II molécula e ser apresentado a uma célula T, sem mais processamento do antígeno, e a capacidade do peptídeo para induzir tolerância in vivo (WO 02/16410). Se um peptídeo é demasiado longo para se ligar a ranhura de ligação ao peptídeo de uma molécula de MHC sem processamento adicional (por exemplo, de corte), ou se liga a uma conformação inadequada, então ele não será tolerogênico *in vivo*. Se, por outro lado, o peptídeo é de um

tamanho e conformação adequada para se ligar directamente ao sulco de ligação de peptídeos de MHC e ser apresentado a uma célula T, em seguida, este peptídeo pode ser previsto para ser útil para a indução de tolerância.

[00087] Assim, é possível investigar a capacidade de um peptídeo tolerogénico, investigando se pode ligar a um MHC de classe I ou II molécula e ser apresentado a uma célula T, sem mais processamento do antígeno in vitro.

[00088] Os peptídeos da presente invenção são apítopos (antígeno de processamento independentes de epítopos), em que eles são capazes de se ligar a uma molécula MHC de classe II e estimulação de uma resposta de células T específica do fator VIII, sem mais processamento do antígeno. Tais apitopos pode ser previsto para causar a tolerância a FVIII, seguindo o método baseado em regras descritas em WO 02/16410.

[00089] Um peptídeo da presente invenção pode ter qualquer comprimento que é capaz de se ligar a um MHC de classe I ou II sem processamento adicional molécula. Tipicamente, o peptídeo da presente invenção é capaz de se ligar a MHC de classe II.

[00090] Os peptídeos que se ligam a molécélulas de classe I de MHC são, tipicamente 7 a 13, mais usualmente, de 8 a 10 aminoácidos de comprimento. A ligação do peptídeo é estabilizada nas suas duas extremidades por contactos entre

os átomos da cadeia principal do peptídeo e locais invariantes no sulco de ligação ao peptídeo de toda a classe I de molécélulas MHC. Existem locais invariantes em ambas as extremidades da ranhura que se ligam terminais amino e carboxilo do peptídeo. Variações comprimento é peptídeo são acomodados por uma torção na estrutura peptídica, muitas vezes em prolina ou glicina que permitem que os resíduos a requerida flexibilidade.

[00091] Os peptídeos que se ligam a molécélulas de MHC de classe II estão normalmente entre 8 e 20 aminoácidos de comprimento, mais usualmente entre 10 e 17 aminoácidos de comprimento, e pode ser mais longos (por exemplo até 40 ácidos aminados). Estes peptídeos encontram-se em uma conformação estendida ao longo do MHC II sulco de ligação de peptídeos que (ao contrário do sulco de classe I-peptídeo de ligação do CPH) é aberta em ambas as extremidades. O peptídeo é realizado no local, principalmente por contatos de átomos da cadeia principal com resíduos conservados que a linha do sulco de ligação ao peptídeo.

Sequências peptídicas

[00092] A primeira concretização da invenção se refere a um peptídeo que compreende uma sequência derivada de FVIII. Sequências derivadas de FVIII que foram investigadas nos exemplos têm as seguintes sequências:

[00093] 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

[00094] SEQ ID NO: 2: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

[00095] SEQ ID NO: 3: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

[00096] SEQ ID NO: 4: Lys-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gli-Glu-Glu

[00097] SEQ ID No. 5: Glu-Glu-Gli-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

[00098] SEQ ID NO: 6: Glu-Glu-Gli-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

[00099] SEQ ID NO: 7: Glu-Glu-Gli-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

[000100] SEQ ID NO: 8: Glu-Glu-Gli-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gli-Glu-Glu

[000101] SEQ ID N ° 9: Lys-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

[000102] ID SEQ N ° 10: Lis-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

[000103] SEQ ID NO: 1 1: Lis-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

[000104] ID SEQ N ° 12: Lis-Glu-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gli-Glu-Glu

[000105] ID SEQ N ° 13: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Lys

[000106] ID SEQ N ° 14: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Lys-Glu

[000107] ID SEQ N ° 15: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gly-Glu-Lys

[000108] ID SEQ N ° 16: Glu-Lys-Gly-Pro-Arg-Cys-Leu-Thr-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Phe-Val-Asn-Met-Glu-Gli-Glu-Glu

[000109] ID SEQ N ° 17: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Lis

[000110] ID SEQ N ° 18: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Glu

[000111] ID SEQ N ° 19: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

[000112] ID SEQ N ° 20: Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Glu-Glu

[000113] ID SEQ N ° 21: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Lis

[000114] ID SEQ N ° 22: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Glu

[000115] ID SEQ N ° 23: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

[000116] ID SEQ N ° 24: Glu-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Glu-Glu

[000117] ID SEQ N ° 25: Lis-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Lis

[000118] ID SEQ N ° 26: Lis-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Glu

[000119] ID SEQ N ° 27: Lis-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys

[000120] ID SEQ N ° 28: Lis-Glu-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Glu-Glu

[000121] ID SEQ N ° 29: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Lis

[000122] ID SEQ N ° 30: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Lis-Glu

[000123] ID SEQ N ° 31: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys.

[000124] ID SEQ N ° 32: Glu-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tir-Gli-Glu-Glu.

[000125] O termo "tem" ou "tendo" pretende significar que o peptídeo consiste na sequência de aminoácidos dada.

[000126] A presente invenção proporciona um peptídeo que compreende a sequência de DNIMVTFRNQASRPY e tem uma das seguintes sequências: SEQ ID NO: 17, 18, 19, 25, 26, 27, 29, 30 ou 31.

[000127] O peptídeo pode ter uma das seguintes sequências: SEQ ID NO: 17, 18, 25 ou 26.

[000128] O peptídeo pode ter a SEQ ID N ° 17 ou 18.

[000129] O peptídeo pode ter a SEQ ID No.17.

[000130] A presente invenção também fornece um peptídeo que compreende a sequência de PRCLTRYYSSFVNME e tem uma das seguintes sequências: SEQ ID N ° 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 1 1 ou 13.

[000131] O peptídeo pode ter uma das seguintes sequências: SEQ ID N ° 1, 2, 9 ou 10.

[000132] O peptídeo pode ter a SEQ ID N ° 1 ou 2.

[000133] O peptídeo pode ter a SEQ ID No. 1.

FATOR VIII

[000134] As sequências DNIMVTFRNQASRPY e PRCLTRYYSSFVNME que formam a porção central dos peptídeos da invenção são ambos produzidos a partir de fator VIII.

[000135] Fator VIII participa na via intrínseca da coagulação do sangue; o fator VIII é um co-fator para o fator IXa, que, na presença de Ca + 2 e fosfolípidos, converte o fator X para a forma ativada Xa.

[000136] O gene do fator VIII produz dois transcritos de splicing alternativo. Transcrição da variante 1 codifica uma glicoproteína grande, uma isoforma, que circula no plasma e associados com fator de Von Willebrand em um complexo não covalente. Esta proteína é submetida a vários eventos de clivagem. Transcrição da variante 2 codifica uma pequena

proteína putativa, isoforma b, que consiste principalmente de o domínio de ligação de fosfolípidos do fator Vila Esta domínio de ligação é essencial para a atividade coagulante.

[000137] A sequência de 186 mil pares de bases completa do gene do fator VIII humano foi elucidada em meados de 1980 (Gitschier et al (1984) Nature 312 326-330). Ao mesmo tempo, os clones de ADN que codificam a sequência de aminoácidos completa 2351 foram utilizados para produzir o fator VIII biologicamente activo em células de mamíferos em cultura (Wood et al (1984) Nature 312: 330-337). A sequência completa do aminoácido 2.351 para o fator VIII humano é dada na SEQ ID N° 33.

SOLUBILIDADE

[000138] O peptídeo da primeira concretização da invenção é uma forma modificada de um dos seguintes peptídeos:

DNIMVTFRNQASRPY
PRCLTRYYSSFVNME

[000139] Estes peptídeos já foram mostrados para agir como apitopos e ser tolerogénico in vivo (ver Exemplos e pedido de patente internacional n ° PCT/GB2008/003996).

[000140] Desde então, veio à luz que a solubilidade é uma consideração importante na indução de tolerância mediado por peptídeo.

[000141] Os presentes inventores descobriram que a solubilidade pode ser melhorada por incorporação de um espaçador de glicina em ambas as extremidades, seguido por combinações de dois aminoácidos adicionais que possam ser Lisina (K) e / ou ácido glutâmico (E) em ambos os terminais N e C. A combinação possível em um dado terminal é, portanto, KK, KE, EK ou EE.

[000142] Os peptídeos modificados da presente invenção, portanto, têm 6 ácidos aminados adicionais (3) em cada extremidade do que a DNIVM pai e peptídeos PRCLT.

[000143] Os peptídeos da presente invenção têm a fórmula geral:

XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX ou

XXGPRCLTRYYSSFVNMEGXX

em que X é ou lisina ou ácido glutâmico.

[000144] O peptídeo modificado pode ser mais solúvel que o peptídeo-mãe (não modificada). O peptídeo modificado pode ter 2, 3, 4, ou 5 vezes maior do que a solubilidade do peptídeo progenitor. O peptídeo pode ser solúvel em concentrações de até 0,5 mg / mL, 1 mg / ml, ou 5 mg / ml.

TOLERÂNCIA

[000145] Epítopos de células T desempenham um papel central na resposta imune adaptativa a qualquer antígeno, se auto ou estrangeira. O papel central desempenhado pelos

epítopos de células T em doenças de hipersensibilidade (as quais incluem alergia, doenças auto-imunes e rejeição de transplantes), foi demonstrado através da utilização de modelos experimentais. É possível induzir doenças inflamatórias ou alérgicas por injecção de peptídeos sintéticos (baseados na estrutura dos epítopos de células T) em combinação com adjuvante.

[000146] Em contraste, tem sido demonstrado que é possível induzir a tolerância imunológica para certos antígenos por administração de epítopos peptídicos na forma solúvel. A administração de antígenos de peptídeo solúvel tem sido demonstrada como um meio eficaz de inibir a doença em encefalomielite autoimune experimental (EAE –a modelo para a esclerose múltipla (MS)) (Metzler e Wraith (1993) Int Immunol 5: 1 159–1 165; Liu e Wraith (1995) Int Immunol 7: 1255–1263; Anderton e Wraith (1998) Eur J. Immunol 28: 1251 –1261);. e modelos experimentais de artrite, diabetes e uveoretinite (revisto em Anderton e Wraith (1998), como acima). Isto também tem sido demonstrada como um meio de tratamento de uma doença em curso na EAE (Anderton e Wraith (1998), como acima).

[000147] A tolerância é a incapacidade de responder a um antígeno. Tolerância a auto-antígenos é uma característica essencial do sistema imune, quando esta é perdida, a doença

auto-imune pode resultar. O sistema imune adaptativo deve manter a capacidade para responder a uma grande variedade de agentes infecciosos, evitando ataques auto-imunes dos auto-antígenos contidos dentro dos seus próprios tecidos. Isto é controlado, em grande medida, pela sensibilidade dos linfócitos T imaturas a morte celular por apoptose no timo (tolerância central). No entanto, nem todos os auto-antígenos são detectados no timo, assim também a morte de timócitos auto-reactivas permanece incompleta. Há, portanto, também os mecanismos através dos quais a tolerância pode ser adquirida pelos linfócitos auto-reativos T maduras nos tecidos periféricos (tolerância periférica). Uma revisão dos mecanismos de tolerância central e periférica é dada em Anderton et al (1999) (Immunological Reviews 169: 123-137).

[000148] Na hemofilia A, os pacientes têm um defeito no gene do fator VIII. Isto significa que o fator VIII não é reconhecido como um "auto" antígeno pelo sistema imune. Quando o fator VIII é administrado durante terapia de substituição de fator de coagulação, portanto, uma resposta aloimune é gerada para a proteína estranha, que leva à produção de anticorpos inibidores de FVIII.

[000149] Os peptídeos da presente invenção são capazes de induzir tolerância ao fator VIII, tal que, quando o FVIII é administrado profilacticamente, que não induz uma resposta

imune e inibidores de FVIII não se desenvolver; e quando é administrada terapeuticamente, a produção de inibidor de FVIII contínua é reduzida ou inibida.

[000150] Hemofilia adquirida é uma doença auto-imune em que a tolerância ao fator VIII decompõe. Neste caso, os peptídeos da presente invenção podem ser administrados para restabelecer a tolerância a este auto-proteína e limitar a resposta imunitária patogénica.

[000151] A tolerância pode resultar ou ser caracterizada pela indução de anergia em, pelo menos, uma porção das células T CD4 +. A fim de activar a célula T, um peptídeo deve associar-se com uma APC "profissional" capaz de entregar dois sinais para as células T. O primeiro sinal (sinal 1) é emitido pelo complexo MHC-peptídeo na superfície celular da APC e recebido pela célula T através do TCR. O segundo sinal (sinal 2) é distribuído por molécélulas co-estimuladoras sobre a superfície da APC, tais como CD80 e CD86 e recebido pela CD28 na superfície da célula T. Pensa-se que, quando uma célula T recebe o sinal 1, na ausência de sinal 2, que não é activado e, na verdade, torna-se anérgicas. Células T anérgicas são refractários a subsequente desafio antigénico, e podem ser capazes de suprimir outras respostas imunes. Células T anérgicas são pensadas para ser envolvido na mediação tolerância da célula T.

[000152] Sem se pretender ficar limitado pela teoria, os presentes inventores prevêem que peptídeos que requerem processamento antes de poderem ser apresentados em conjunto com molécélulas de MHC não induzem tolerância, porque eles têm que ser tratadas por células apresentadoras de antígenos maduros. Células apresentadoras de antígeno maduro (tais como macrófagos, células B e células dendríticas) é capaz de processamento do antígeno, mas também de proporcionar ambos os sinais 1 e 2 a uma célula T, conduz à activação da célula T. Apítopos, por outro lado, será capaz de se ligar MHC de classe II na APC imaturas. Assim, eles serão apresentados às células T sem co-estimulação, levando a anergia das células T e tolerância.

[000153] Naturalmente, apitopos também são capazes de se ligar a molécélulas MHC na superfície celular de APC maduras. No entanto, o sistema imune contém uma maior abundância de APC imaturas do que maduras (foi sugerido que menos de 10% das células dendríticas são activados, Summers et al (2001) Am J. Pathol 159:285-295). A posição padrão de um apitopo, por conseguinte, vai ser anergia / tolerância, ao invés de activação.

[000154] A indução de tolerância de FVIII pode ser monitorizada in vivo pelo procurando uma redução no nível de:

(I) os anticorpos inibidores de FVIII:

[000155] (Ii) células T CD4 + específicas para o FVIII

[000156] (Iii) as células B, capazes de segregar anticorpos inibidores de FVIII por meio de técnicas conhecidas no estado da técnica.

[000157] A indução de tolerância pode, por conseguinte, também ser monitorizada por várias técnicas, incluindo:

(A) a indução de anergia nas células T CD4 + (a qual pode ser detectada pelo desafio subsequente com o FVIII in vitro);

(B) mudanças na população de células CD4 + T, incluindo

(i) redução da proliferação;

(ii) sub-regulação da produção de IL-2, IFN-γ e IL-4; e

(iii) aumento da produção de IL-10.

[000158] Tal como aqui utilizado, o termo "tolerogénico" significa capaz de induzir tolerância.

COMPOSIÇÃO

[000159] A presente invenção também se relaciona com uma composição, tal como uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeo (s), de acordo com a invenção.

[000160] A composição pode compreender uma forma modificada do peptídeo DNIMVTFRNQASRPY e uma forma modificada do peptídeo PRCLTRYYSSFVNME.

[000161] O peptídeo pode compreender uma pluralidade de

peptídeos, por exemplo, duas, três, quatro, cinco ou seis peptídeos.

[000162] A composição do presente invento pode ser para uso profilático ou terapêutico.

[000163] Quando administrados para o uso profiláctico, a composição pode reduzir ou impedir a geração de uma resposta imunitária ao FVIII. O nível da resposta imunitária é menor do que teria sido obtido em que o paciente não tinha sido tratado com a composição. O termo "reduzir" indica que uma redução parcial na resposta imune é observada, tal como 50%, 70%, 80% ou 90% de redução na resposta que teria sido observada no paciente não tinha sido tratada com a composição (ou na resposta observada num doente não tratado durante o mesmo período de tempo). O termo "prevenir" indica que não há resposta imune significativa para o FVIII é observada.

[000164] Quando administrados para o uso terapêutico, a composição pode suprimir uma resposta imune já em curso para o FVIII. O termo "suprimir" indica uma redução no nível de uma resposta imunitária em curso, em comparação com o nível antes do tratamento peptídeo, ou o nível que teria sido observado no mesmo ponto de tempo tinha o tratamento não foi determinado.

[000165] O tratamento com a composição da presente invenção pode causar uma redução nos níveis de qualquer ou

todas as seguintes características:

(i) os anticorpos inibidores de FVIII:

(ii) células T CD4 + específicas para o FVIII

(iii) células B secretoras de anticorpos inibidores de FVIII.

[000166] A detecção de todos estes fatores pode ser realizada através de técnicas conhecidas no estado da técnica, tais como ELISA, citometria de fluxo, ensaio de coagulação cromogênica, etc.

[000167] O tratamento com a composição da presente invenção ou, alternativamente, também pode provocar anergia nas células T CD4 + específicas para o FVIII. A anergia pode ser detectado por, por exemplo, o desafio subsequente com o FVIII *in vitro*.

[000168] É importante ter em mente que nem todas as respostas imunes a FVIII são patogênicas. Os anticorpos não inibitória anti-FVIII podem ser encontrados em doentes com hemofilia sem inibidores (Moreau et ai (2000) Blood 95:3435-41) e, aproximadamente, 15% dos dadores de sangue saudáveis (Algiman et ai (1992) 89: 3795-9).

[000169] Inibidores de FVIII pode ser detectado pela modificação Nijmegen do ensaio de Bethesda de coagulação, em que a capacidade do plasma do paciente para inactivar o FVIII no plasma normal é testado. A unidade de Bethesda é definida

como a quantidade de anticorpo que neutraliza 50% da atividade de FVIII no plasma, e os títulos de 0.6BU maior ou sugerem a presença de anticorpo.

[000170] Os inibidores são geralmente classificados como baixo título se o nível é <5 BU e título elevado se ≥ 5 BU.

[000171] O nível de anticorpos inibidores de FVIII circulante pode ser reduzida para 90%, 75%, 50%, 20%, 10% 5% do nível de anticorpos que tenham sido observados tinham o paciente não recebeu tratamento.

[000172] O nível de anticorpos inibidores de FVIII circulante pode ser reduzida para 5, 4, 3, 2, 1 ou 0,5 BU.

[000173] Os peptídeos e a composição da invenção podem aumentar a quantidade ou proporção de FVIII administrado terapeuticamente, que está disponível para auxiliar a coagulação num doente. Isto é devido à redução em inibidores de FVIII que podem efectivamente remover uma proporção de FVIII de exercer a sua função terapêutica. O peptídeo ou

[000174] A composição da invenção pode aumentar a quantidade disponível de FVIII por, por exemplo, 10%, 25%, 50%, 75% ou 100%.

[000175] Os peptídeos e composições da invenção podem, assim, reduzir a quantidade de FVIII que deve ser administrada para auxiliar a coagulação num doente.

FORMULAÇÃO

[000176] A composição pode ser por preparada como injetável, quer como solução ou suspensão líquida; forma sólida adequada para solução em, ou suspensão em, líquido antes da injeção podem também ser preparadas. A preparação pode também ser emulsionada, ou os peptídeos encapsulados em lipossomas. Os ingredientes ativos podem ser misturados com excipientes que são farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. Os excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), dextrose, glicerol, etanol, ou semelhantes e suas combinações.

[000177] Além disso, se desejado, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes e / ou agentes de tamponamento do pH. Sais tamponantes incluem fosfato, citrato, acetato, ácido clorídrico e / ou hidróxido de sódio podem ser usados para ajuste de pH. Para a estabilização, dissacáridos podem ser utilizadas, tais como sacarose ou trealose.

[000178] Se a composição compreende uma pluralidade de peptídeos, a proporção relativa dos peptídeos pode ser aproximadamente igual. Em alternativa, as proporções relativas de cada um peptídeo podem ser alteradas, por

exemplo, para focar a resposta tolerogénico sobre um sub-conjunto específico de células-T auto-reactivas, ou se se verificar que um peptídeo funciona melhor do que os outros tipos de HLA em particular.

[000179] Após a formulação, a composição pode ser incorporada num recipiente estéril, a qual é então selado e armazenado a uma baixa temperatura, por exemplo 4 ° C, ou pode ser liofilizado.

[000180] Convenientemente, a composição é preparada como um (liofilizado) em pó liofilizado. A liofilizao permite o armazenamento a longo prazo em uma forma estabilizada. Liofilização

[000181] os procedimentos são bem conhecidos no estado da técnica, ver por exemplo http://wwvv.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html. Os agentes espessantes são normalmente usados antes da liofilização, tal como manitol, dextrano ou glicina.

[000182] A composição pode ser administrada de uma forma conveniente tal como pelas vias oral, intravenosa (quando solúvel em água), intramuscular, subcutânea, sublingual, intranasal, intradérmica ou por supositórios ou rotas implantação (por exemplo, usando molécélulas de libertação lenta).

[000183] A composição pode vantajosamente ser

administrada por via intranasal, subcutânea ou intradérmica.

[000184] O peptídeo e composição da invenção pode ser utilizado para tratar um sujeito humano. O sujeito pode ter hemofilia A, em particular grave hemofilia A. O indivíduo pode ser geneticamente deficiente em FVIII. O sujeito pode ter hemofilia adquirida. O sujeito pode ter anticorpos anti-FVI 11 inibitórios.

[000185] O sujeito pode ser submetido ou prestes a passar por terapia de reposição coagulante com FVIII.

[000186] O sujeito pode ser submetido ou prestes a passar por terapia com agentes contornando [com ou sem terapia de reposição coagulante com FVIII].

[000187] O indivíduo pode estar a sofrer ou prestes a sofrer a terapia génica com o gene de FVIII.

[000188] O sujeito pode ser um haplótipo HLA-que está associada a uma predisposição para desenvolver aloanticorpos ou auto-anticorpos anti-FVIII inibidores. O sujeito pode expressar HLA-DR2. Os métodos para a determinação do haplótipo HLA de um indivíduo são conhecidos na arte.

[000189] Tipicamente, um médico determinará a dosagem actual que será mais adequada para um sujeito individual, e ela variará com a idade, peso e resposta do paciente particular.

[000190] Em uma concretização preferida, um protocolo

de "escalonamento de dose" pode ser seguido, onde uma pluralidade de doses é dada ao paciente em concentrações ascendentes. Essa abordagem foi utilizada, por exemplo, para a fosfolipase A2 peptídeos em aplicações imunoterapêuticas contra alergia veneno de abelha (Mijller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol 101:747-754 e Akdis et al (1998) J. Clin. Invest 102:98-106).

KITS

[000191] Convenientemente, se a composição compreende uma pluralidade de peptídeos, eles podem ser administrados em conjunto, na forma de uma composição mista, ou um cocktail. No entanto, pode haver circunstâncias em que é preferível para proporcionar os peptídeos separadamente sob a forma de um kit, para a administração simultânea, em separado, sequencial ou combinado.

[000192] O kit também pode compreender a mistura e / ou meios de administração (por exemplo, um vapouriser para administração intranasal, ou uma seringa e uma agulha para administração por via subcutânea / intradérmica). O kit pode também incluir instruções para utilização.

[000193] A composição farmacêutica ou um kit da invenção podem ser utilizados para tratar e / ou prevenir uma doença.

[000194] Em particular, a composição / kit pode ser

utilizado para tratar e / ou prevenir a formação de inibidor anti-FVIII em doentes com hemofilia A ou hemofilia adquirida. A composição / kit pode ser utilizado para tratar a hemofilia prejudicada pela presença de anticorpos neutralizantes de FVIII.

HEMOFILIA A

[000195] A hemofilia A (hemofilia clássica), é provocada pela deficiência de fator VIII.

[000196] A Hemofilia A tem uma incidência estimada de 1 em 10.000 homens, enquanto a hemofilia B é estimada para ocorrer em um em cada 40 mil homens. Cerca de 1 mulher em 5000 é um portador para hemofilia A, e 1 em 20.000 é um portador da hemofilia B.

[000197] A hemofilia é tipicamente dividida em três classes: grave, moderada e suave, com base no nível do fator de coagulação no sangue. Na hemofilia A grave, não é menos do que 1 por cento de fator de coagulação normal. O grau de gravidade tende a ser consistente de geração para geração.

[000198] Ao contrário da crença popular, pequenos cortes e feridas geralmente não representam uma ameaça para os hemofílicos. Pelo contrário, o maior perigo vem de hemorragia espontânea que pode ocorrer nas articulações e músculos. Isso é mais propenso a ocorrer durante os anos de crescimento rápido, geralmente entre as idades de 5 e 15

anos.

[000199] Sangramento espontâneo repetido nas articulações pode causar artrite, e os músculos adjacentes enfraquecem. A pressão sobre os nervos causados pela acumulação de sangue podem resultar em dor, dormência, e incapacidade temporária para mover a área afectada.

[000200] A hemofilia A é geralmente diagnosticada com um teste de sangue para determinar a eficácia de coagulação e para investigar se os níveis de fatores de coagulação são anormais.

[000201] O desenvolvimento de fatores de coagulação purificados na década de 1970, isolado do sangue doado, melhoraram significativamente as perspectivas de longo prazo para os hemofílicos. Leve a moderada hemofílicos pode usar o tratamento com FVIII em uma base ad hoc, enquanto hemofílicos graves podem requerer, o tratamento por tempo indeterminado regular.

[000202] Anteriormente, os pacientes receberam concentrados de fator VIII reunidos a partir de milhares de doações de plasma. Isto leva a problemas significativos de contaminação com agentes patogénicos virais, particularmente o vírus da imunodeficiência humana e os vírus da hepatite. Técnicas de purificação de anticorpos monoclonais, inativação térmica e tratamentos de detergente virucidas tornaram

concentrados derivados de plasma relativamente seguro.

[000203] Tecnologia de DNA recombinante proporcionou agora uma série de produtos sintéticos, tais como Recombinate ™ e Kogenate ™. O Kogenate é feito usando células de rim de hamster bebé que expressam o fator VIII humano. O fator resultante é altamente purificado, eliminando qualquer possibilidade de transmissão de vírus a partir de plasma.

[000204] O peptídeo ou composição da presente invenção podem ser administradas antes e / ou durante a terapia de reposição de fator VIII.

[000205] A hemofilia A é uma doença alvo ideal para a terapia de gene uma vez que i) é causada por uma mutação de um único gene identificado, ii) um ligeiro aumento nos níveis de fator de coagulação in vivo que podem ser transformadas em hemofilia A grave doença mais suave, e iii) as terapias actuais de substituição são considerados subóptima. Além disso, há uma vasta gama de segurança, se houver um "excesso" de nível desejado de atividade de coagulação.

[000206] Infelizmente, até à data, a promessa da terapia génica como uma cura para a hemofilia não foi realizada, principalmente, por causa da dificuldade em encontrar um sistema de entrega de genes, que seja suficientemente não-imunogênico para permitir a expressão de longa duração do fator de coagulação.

[000207] Os peptídeos da presente invenção também são adequados para criar tolerância a um sujeito antes da terapia gênica com o fator VIII e / ou gestão da formação de inibidores de FVIII num paciente após a terapia génica.

HEMOFILIA ADQUIRIDA

[000208] Hemofilia adquirida é caracterizada pela presença de auto-anticorpos inibidores contra FVIII em indivíduos com coagulação previamente normal. É uma condição rara, com uma incidência estimada de 1-3 por milhão de habitantes por ano. A taxa de mortalidade associada com inibidores de auto-anticorpos adquiridos se aproxima de 25% em relação ao substancialmente menor risco de morte em pessoas com aloanticorpos.

[000209] Em comparação com pacientes com inibidor aloanticorpo, hemofilia adquirida é caracterizada por: (1) um padrão de sangramento mais grave; (2) maior incidência na população idosa; (3) em conjunto com a ocorrência de doenças auto-imunes subjacentes identificáveis, linfoproliferativas malignas ou tumor sólido, gravidez e uso de certos antibióticos, tais como penicilina e sulfonamidas em aproximadamente 50% dos casos; e (4) atividade do inibidor *in vitro* que segue um padrão farmacocinético do tipo II com a neutralização incompleta da atividade do fator de coagulação do alvo pelo auto-anticorpo, resultando tipicamente em níveis

residuais do fator VIII que variam entre 2% e os 18% no plasma do doente.

[000210] O peptídeo ou composição da presente invenção pode ser administrada a um doente com hemofilia adquirida, ou a um paciente que se acredita ser em risco de desenvolver hemofilia adquirida devido a, por exemplo:

i) tratamento com iminente, por exemplo, penicilina ou uma sulfonamida

ii) a progressão de um tumor ou outra malignidade

iii) a gravidez iminente ou precoce.

[000211] A invenção será agora adicionalmente descrita por meio de Exemplos, os quais se destinam a servir para auxiliar um técnico versado no assunto na realização da presente invenção e não se destinam, de modo algum a limitar o escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Estudo da solubilidade de peptídeos derivados de FVIII.

[000212] Um total de 32 peptídeos foram testados: 16 dos quais foram baseadas no peptídeo de FVIII-PRCLTRYYSSFVNME ("PRCLT"); e 16 dos quais foram baseadas no peptídeo de FVIII -DNIMVTFRNQASRPY ("DNIMV"). Os peptídeos estão resumidos nas Tabelas 1 e 2 abaixo.

Tabela 1 - Peptídeos derivados de PRCLT

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

	Lys-Glu	
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

Tabela 2 – Peptídeos derivados de DNIMV

No do Peptídeo	Sequência	SEQ ID No.
17	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Lys	17
18	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Lys-Glu	18
19	Lys-Lys-Gly-Asp-Asn-Ile-Met-Val-Thr-Phe-	19

	Arg-Asn-Gln-Ala-Ser-Arg-Pro-Tyr-Gly-Glu-Lys	
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-	29

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

[000213] Uma solução de estoque de cada peptídeo de teste de 20 mg / ml foi preparada em DMSO. Uma solução de stock do peptídeo de controle, um peptídeo de MBP-derivado conhecido como 4Y também foi preparado em DMSO. 4Y peptídeo tem a sequência Ac-ASQYRPSQR. É estruturalmente diferente para os peptídeos de teste, mas é conhecido por ser suficientemente solúvel para ser aplicado como um antígeno tolerante.

[000214] Diluições sequenciais de um volume de solução 40µl de peptídeo foram efetuadas por adição de água em uma placa de 96 poços para dar concentrações de 10, 5, 2,5 e 1,25 mg / mL

[000215] As placas foram deixadas à temperatura ambiente durante 1 hora para permitir que qualquer precipitado para formar e, em seguida, centrifugada a 14,800 rpm durante 10 minutos para separar o precipitado de peptídeo

/ coloidal de soluto verdadeiramente dissolvido.

[000216] Uma amostra de 2µl da parte superior de cada tubo foi removido para análise. A absorvância foi medida a um comprimento de onda de 280 nm e a concentração (mg / mL) foi calculado.

[000217] Os resultados são mostrados na Figura 1. Alguns peptídeos marcados demonstrou uma solubilidade equivalente a 4Y, mesmo em alta concentração. Peptídeos codificados verde eram tão solúveis como peptídeo de controle 4Y, peptídeos codificados em vermelho eram pouco solúveis, e um peptídeo âmbar codificado tinha solubilidade intermediária.

Exemplo 2 – Dissolução direta de peptídeos marcados em solvente aquoso, em uma concentração clinicamente relevante

[000218] Para cada peptídeo de teste e os peptídeos-mãe (PRCLT DNIMV) e dois tubos foram preparadas a 4 mg / ml em ambos DMSO (controle) ou PBS.

[000219] Cada tubo foi girado à velocidade máxima em uma mini-centrifuga-se durante 5 minutos. Uma amostra 10µI_ foi removido a partir do topo de cada solução e o peso molecular e o coeficiente de absorção foram registados para cada peptídeo.

[000220] A absorvência do sobrenadante foi medida utilizando NanoDrop e a concentração calculada. A

concentração real foi comparada com o valor esperado de 4 mg / ml e os resultados são mostrados na Figura 2. Nesta Figura, uma maior disparidade entre a concentração real e espera corresponde a diminuir a solubilidade relativa.

[000221] Como mostrado na Figura 2, os peptídeos marcados SEQ ID N ° 1, 2, 9, 10, 17, 18, 25 e 26 todos tinham uma solubilidade melhorada em PBS em comparação com os peptídeos parentais.

Exemplo 3 - Peptídeos marcados atuando como apítopos

[000222] Camundongos transgênicos HLA-DR2 foram imunizadas com peptídeos parentais PRCLT ou DNIMV. O baço e os nódulos linfáticos foram então colhidos, e após purificação CD4, as células foram novamente estimuladas com 1 ug / mL de FVIII recombinante humano. Após a fusão com células BW5147, os clones resultantes foram expandidos e no respeitante a especificidade para DNIMV ou PRCLT. Isto é realizado através da incubação de células de hibridoma com $5x10^{4}$ células apresentadoras de antígeno DR2-positivas (linha celular MGAR) e 10 ug / ml PRCLT / ou meios DNIMV durante 48 horas. Os sobrenadantes foram então analisados para IL-2 por ELISA de produção.

[000223] Os clones que produziram IL-2 quando especificamente incubados com peptídeo foram expandidos e pesquisados novamente com FVIII (a 1 ug / mL).

[000224] Os clones que produziram IL-2 em resposta a ambos FVIII e peptídeo foram então usadas para avaliar se os DNIMV PRCLT e peptídeos modificados são apítopos, isto é, se eles são capazes de se ligar a uma molécula MHC e ser apresentado a uma célula T por fixos e fresco APC.

[000225] $5x10^{4}$ células de hibridoma foram incubados com 5×10^{4} células MGAR fixos, e 10 ug / ml de peptídeo, 1 µg / mL de FVIII ou meios, durante 48 horas. Os sobrenadantes foram então analisados para IL-2 utilizando o método ELISA. Os resultados são apresentados para PRCLT na Figura 3a e para DNIMV na Figura 3b.

[000226] Todos os peptídeos marcados foram capazes de serem apresentados por células apresentadoras de antígeno imobilizado, indicando que são todos os apitopos como os peptídeos parentais PRCLT e DNIMV.

Exemplo 4: Tolerância das células T *ex vivo*

[000227] Para determinar se apitopos modificados foram capazes de regular as respostas de células T aos peptídeos parentais, os camundongos transgênicos HLA-DR2 machos foram tratados com 3 x 100 µg de peptídeo (peptídeos SEQ ID nº 1, 2, 17 ou 18) ou PBS como controle, e em seguida imunizados com 100µç de cada um dos peptídeos de origem (PRCLT e DNIMV) em adjuvante de Freund completo. Dez dias mais tarde, os nódulos linfáticos de drenagem e os baços foram recolhidos e

estimulados *in vitro* com qualquer PRCLT ou DNIMV. Os resultados são mostrados nas Figuras 4 (PRCLT) e 5 (DNIMV). O tratamento com os peptídeos modificados SEQ ID N° 1 ou da SEQ ID N° 2 reduz as respostas de células T para PRCLT e o tratamento com os peptídeos modificados SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18 reduz as respostas de células T para DNIMV. Assim, os peptídeos modificados são capazes de reduzir uma resposta imunitária de murganhos imunizados com o peptídeo progenitor.

Exemplo 5: Tolerância das células T *ex vivo*

[000228] A fim de determinar se o efeito de apítopos modificados na regulação das respostas das células T aos peptídeos parentais estendidos para regular respostas para FVIII, os ratos transgénicos HLA-DR2 fêmeas foram tratados com 3x100 µg de peptídeo (peptídeos SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID No. 17), e, em seguida, preparado com 10C ^ g de cada um dos peptídeos de origem (PRCLT e DNIMV) em adjuvante de Freund completo. Dez dias mais tarde, os nódulos linfáticos de drenagem foram recolhidos e estimulados in vitro com qualquer PRCLT, DNIMV ou de FVIII recombinante. Os resultados são mostrados na Figura 6. Peptídeo SEQ ID n ° 1 de forma significativa ($p < 0,01$) reduziu a resposta de células T ao peptídeo PRCLT. Peptídeo SEQ ID N° 17 de forma significativa ($p < 0,02$) reduziu a resposta de células T a DNIMV.

[000229] O Peptídeo da SEQ ID No.1 regulou respostas a

PRCLT e peptídeo SEQ ID No.17 regulou respostas para DNIMV. Houve também uma redução, que não foi significativa, em resposta a FVIII com peptídeos individuais. Para melhorar a eficácia dos peptídeos contra FVIII respostas imunitárias uma combinação de DNIMV modificado e modificado PRCLT foram usadas em experiências adicionais.

Exemplo 6: Prevenção de geração de anticorpos com um escalonamento de dose de uma combinação de peptídeos e PRCLT DNIMV modificados

[000230] Camundongos transgênicos HLA-DR2 machos foram tratados com a combinação de peptídeo SEQ ID No. 1 e o peptídeo SEQ ID No. 17, seguindo um protocolo de escalonamento de dose. Seis injeções da combinação foram dadas na dose seguinte: 0,1; 10,0; 10 e 3x100 mg (para cada peptídeo em combinação).

[000231] Os animais foram então reforçados semanalmente com 1 µg de FVIII humano recombinante e um tratamento concomitante (3 dias após a imunização de rFVIII) com uma combinação de peptídeos de SEQ ID Nº 1 / SEQ ID Nº 17 (100 mg cada) e a geração de anticorpos anti-FVIII anticorpos analisados a partir de amostras de sangue colhidas após 4 e 8 imunizações FVIII (dia 28, Figura 7a; dia 56, Figura 7b, respectivamente). Os soros foram titulados e analisados por ELISA direto. O título de anticorpos para os camundongos não

imunizados foi negativo em todos os casos, ao passo que o anticorpo anti-FVIII foi considerado presente nos soros de camundongos tratados em que o coeficiente (usando soros negativos para calcular a proporção) de ligação era maior do que 1,9. Os resultados são mostrados na Figura 7, a e b para o dia 28 e o dia 56 do ensaio, respectivamente.

[000232] Além disso, os anticorpos neutralizantes de FVIII foram medidos no dia 56. Os anticorpos neutralizantes de FVIII foram determinadas utilizando um método cromogénico. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 IU / mL FVIII e coagulação foi iniciada por adição de FIX, FX, Trombin, caci $_2$ e fosfolípidos. Após a incubação, a quantidade de FXa gerado foi determinada por adição de substrato cromogénico S-2760 e o sinal de OD foi medido. O sinal de OD é proporcional à atividade de FVIII nas amostras e é comparado com amostras contendo uma quantidade conhecida de FVIII e não há anticorpos neutralizantes. A% de atividade restante da amostra de teste foi calculada em comparação com as amostras de referência e expressos em unidades de Bethesda como e mostrado na Figura 8. Os camundongos tratados com peptídeos de SEQ ID 1 e SEQ ID17 tinha um nível significativamente inferior de anticorpos neutralizantes anti-FVIII do que os ratos tratados com PBS.

Exemplo 7: Tolerância de células T ex vivo utilizando um escalonamento de dose de uma combinação de peptídeos e PRCLT DNIMV modificados

[000233] Camundongos macho / fêmea DR2 foram tratados com a combinação de peptídeos SEQ ID NO: l / SEQ ID NO: 17 seguindo um protocolo de escalonamento de dose, tal como descrito no Exemplo 6.

[000234] Os animais foram sensibilizados com 100 µg PRCLT e 100 µg de DNIMV em CFA. Dez dias mais tarde, células de nódulos linfáticos de drenagem e os esplenócitos foram isolados e re-estimuladas *in vitro* com o FVIII recombinante humano.

[000235] As respostas das células T foram avaliadas por ensaios de proliferação (Figura 9). Uma redução significativa das respostas de células T para o FVIII foram observados em todas as concentrações testadas de FVII I quando os camundongos foram tratados com a combinação de peptídeos de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 17.

Exemplo 8: Supressão de neutralizar a geração de anticorpos com um escalonamento de dose de uma combinação de PRCLT DNIMV e peptídeos modificados em um modelo animal terapêutico

[000236] Camundongos transgênicos HLA-DR2 foram sensibilizados com 3 µg de rFVIII em CFA e três semanas após a imunização tratados com a combinação do peptídeo ID SEQ N °

1 e o peptídeo SEQ ID No. 17, seguindo um protocolo de escalonamento de dose. Seis injecções de combinação foram dadas na dose seguinte: 0,1; 10,0; 10 e 3x100 mg (para cada peptídeo em combinação). Os animais de controle foram tratados com uma ligação de FVIII DR2-fosfatase não relacionadas com o ácido prostático (PAP) 133-152 peptídeo (de sequência, tal como descrito na patente de invenção PCT/US2006/031961, ID SEQ N ° 15) utilizando o mesmo protocolo de escalonamento de dose. Todos os animais receberam uma imunização de reforço com 3 µg de rhFVIII na IFA cinco semanas após a imunização rFVIII e 4 dias após a última rodada de tratamento peptídeo. Geração de anticorpos neutralizantes foi analisada a partir de amostras de plasma colhidas 3 semanas após a primeira imunização de FVIII e antes de qualquer tratamento peptídeo, na semana 5 (antes do impulso de FVIII imunização e depois do tratamento de peptídeo) e durante um período de seguimento na semana 7, 9 e 13. Os níveis de anticorpos de neutralização de FVIII em amostras de plasma foram determinadas como descrito no Exemplo 6.

[000237] Os resultados na figura 10 mostram que o tratamento com peptídeos de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 17 de três semanas após a imunização com o FVIII (Semana 3) suprimem a formação de anticorpos neutralizantes anti-FVIII

significativamente após a imunização de reforço (Semana 5) em comparação com tratamento com o peptídeo de controle.

[000238] Todas as publicações mencionadas no relatório descritivo acima são aqui incorporadas por referência. Várias modificações e variações dos métodos descritos e sistema da invenção serão evidentes para os técnicos versado no assunto sem afastamento do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em ligação com concretizações preferidas específicas, deverá ser entendido que a invenção como reivindicado não deverá ser indevidamente limitada a tais concretizações específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção que são óbvias para os especialistas em imunologia molecular ou campos relacionados destinam-se a estar dentro do escopo das seguintes reivindicações.

SEQ ID No.33

1 mqielstcff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdl gelpvdarfp prvpksfpfn
61 tsvvykktlf veftdhlfni akprppwmgl lgptiqaevy dtvvitlknm ashpvslhav
121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lhkfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
241 aasarawpkm htvngyvnrs lpgligchrk svywhvigmg ttpevhsifl eghtflvrnh
301 rqasleispi tfltaqtllm dlgqfllfch isshqhdgme ayvkvdscpe epqlrmknne
361 eaedydddlt dsemdvvrfd ddnspsfiqi rsvakkhpkt wvhyiaaeee dwdyaplvla
421 pddrsyksqy lnngpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
481 liifknqasr pyniyphgit dvrplysrrl pkgvkhlkdf pilpgeifky kwtvtvedgp
541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde
601 nrswylteni qrflpnpagv qledpefqas nimhsingyv fdslqlsvcl hevaywyils
661 igaqtdflsv ffsgytfkhk mvyedtltlf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrnrg
721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknnaieprs fsqnsrhpst rqkqfnatti

781 pendiektdp wfahrtpmpk iqnvsssdll mllrqsptph glslsdlqea kyetfsddps
841 pgaidsnnsl semthfrpql hhsgdmvftp esglqlrlne klgttaatel kkldfkvsst
901 snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmpv hydsqldttl fgkkssplte sggplslsee
961 nndskllesg lmnsqesswg knvsstesgr lfkgkrahgp alltkdnalf kvsisllktn
1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatalrl
1081 nhmsnkttss knmemvqqkk egpippdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nflseknkvv vgkgeftkdv glkemvfpss rnlfltnldn
1201 lhennthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgtk nfmknlflls trqnvegsyd
1261 gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtkqiveky acttrispnt
1321 sqqnfvtqrs kralkqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrsplpia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpaasy
1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlslailtle mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp
1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldlv egsllqgteg aikwneanrp
1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtilsl
1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnpp vlkrhqreit rttlqsdqee
1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm sssphvlrnr
1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtfrnqasr
1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
1861 dlekdvhsgl igpllvchtn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmaqdqrir wyllsmgsne nihsihfsgh
1981 vftvrkkeey kmalynlypg vfetvemlps kagiwrvecl igehlhagms tlflvysnkc
2041 qtplgmasgh irdfqitasg qygqwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdllapmii
2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
2161 ppiiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvttqgvksl ltsmyvkefl
2281 isssqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvvnsldppl ltrylrihpq swvhqialrm
2341 evlgceaqdl y

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo **caracterizado pelo** fato de que compreende a sequência DNIMVTFRNQASRPY derivada de FVIII, a qual o peptídeo (a) tem a fórmula

XXGDNIMVTFRNQASRPYGXX

em que X é tanto lisina quanto ácido glutâmico; e

(b) tem uma das seguintes sequências:

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 17)

KKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 18)

KKGDNIMVTFRNQASRPYGEK (SEQ ID No. 19)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 25)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 26)

KEGDNIMVTFRNQASRPYGEK (SEQ ID No. 27)

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKK (SEQ ID No. 29)

EKGDNIMVTFRNQASRPYGKE (SEQ ID No. 30), e

EKGDNIMVTFRNQASRPYGEK (SEQ ID No. 31).

2. Peptídeo **caracterizado pelo** fato de que compreende a sequência PRCLTRYYSSFVNME derivada de FVIII, a qual o peptídeo (a) tem a fórmula

XXGPRCLTRYYSSFVNMEGXX

em que X é tanto lisina quanto ácido glutâmico; e

(b) tem uma das seguintes sequências:

KKGPRCLTRYYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 1)

KKGPRCLTRYYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 2)

KKGPRCLTRYYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 3)

EEGPRCLTRYYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 5)

EEGPRCLTRYYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 7)

KEGPRCLTRYYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 9)

KEGPRCLTRYYSSFVNMEGKE (SEQ ID No. 10)

KEGPRCLTRYYSSFVNMEGEK (SEQ ID No. 11), e EKGPRCLTRYYSSFVNMEGKK (SEQ ID No. 13).

3. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende um peptídeo conforme definido pela reivindicação 1.

4. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende um peptídeo conforme definido pela reivindicação 2.

5. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende dois ou mais peptídeos conforme definido pela reivindicação 1 ou reivindicação 2.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que compreende pelo menos um peptídeo conforme definido pela reivindicação 1 e pelo menos um peptídeo conforme definido pela reivindicação 2.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que compreende um peptídeo que possui a SEQ ID No.: 1 e um peptídeo que possui a SEQ ID N_O.: 17.

8. Uso de um peptídeo conforme definido pela reivindicação 1 ou 2 ou de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 7 **caracterizado pelo** fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento de hemofilia.

9. Uso de um peptídeo ou de uma composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que a hemofilia é hemofilia A.

10. Uso de um peptideo ou de uma composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que a hemofilia é hemofilia adquirida.

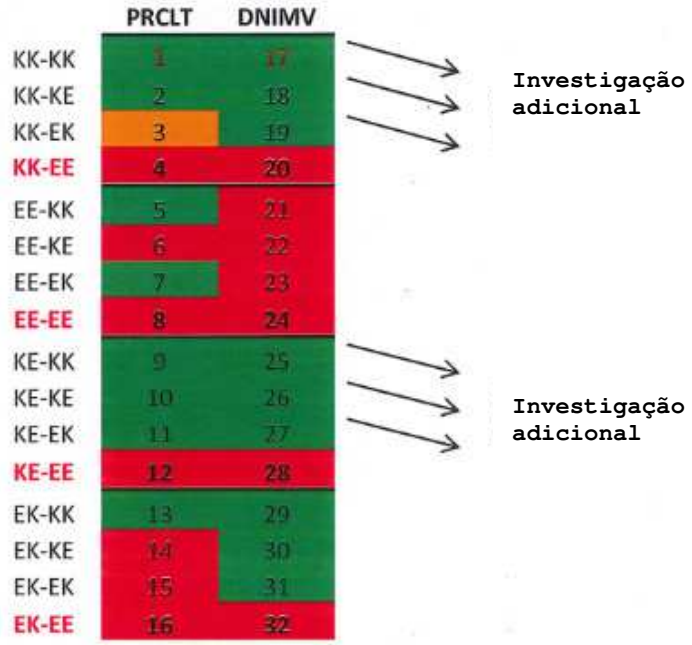


Figura 1

Solubilidade aquosa

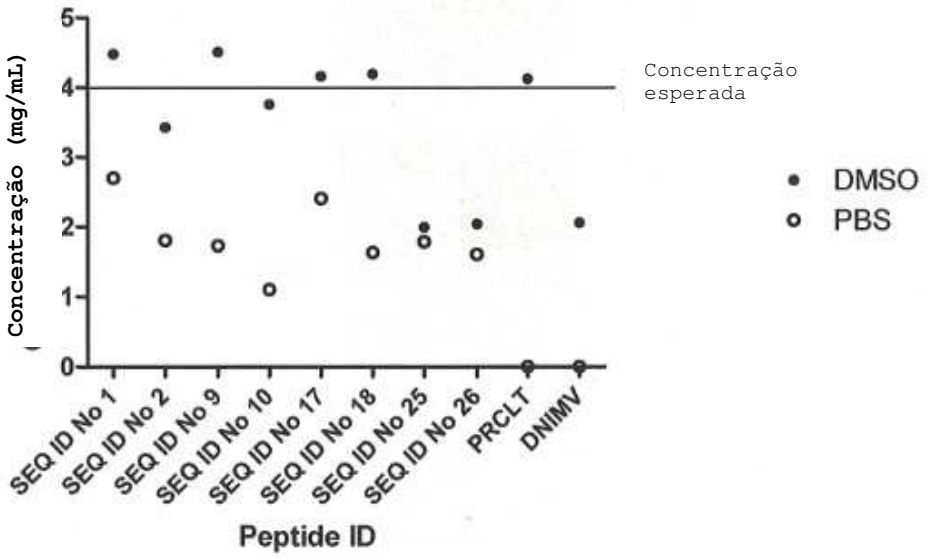
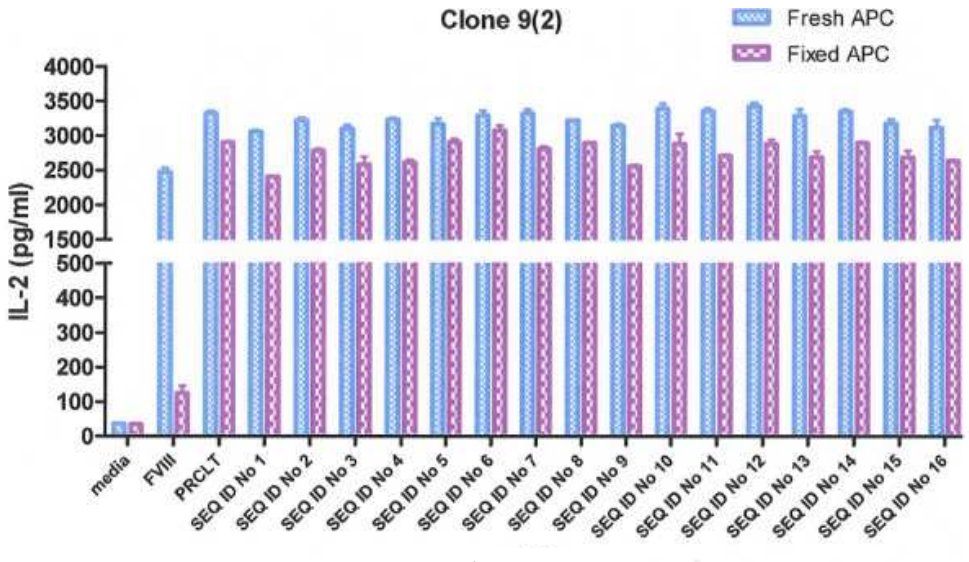
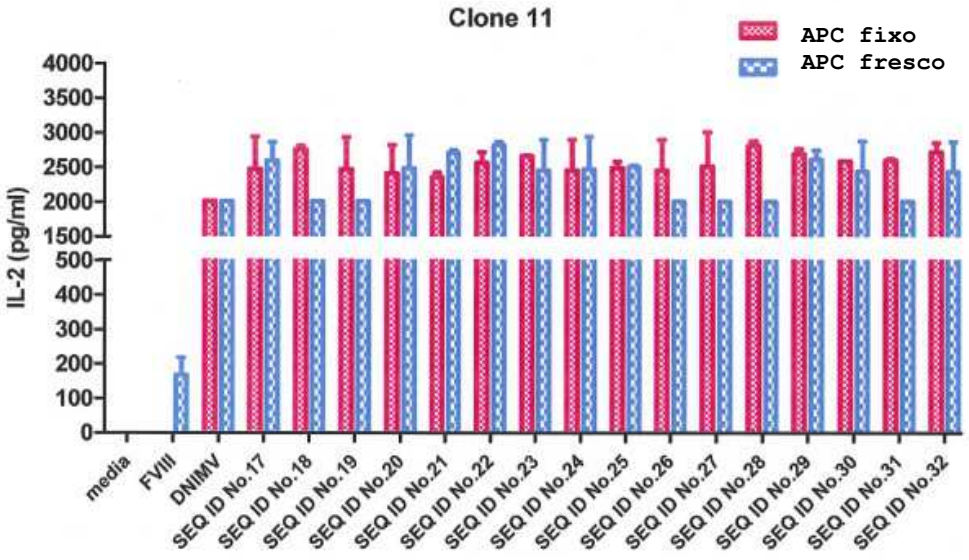


Figura 2



Peptídeo

Figura 3a



Peptídeo

Figura 3b

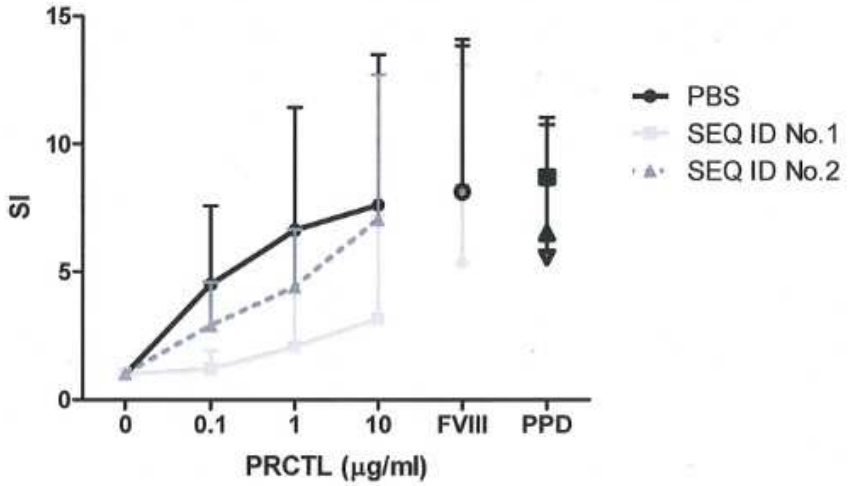


Figura 4

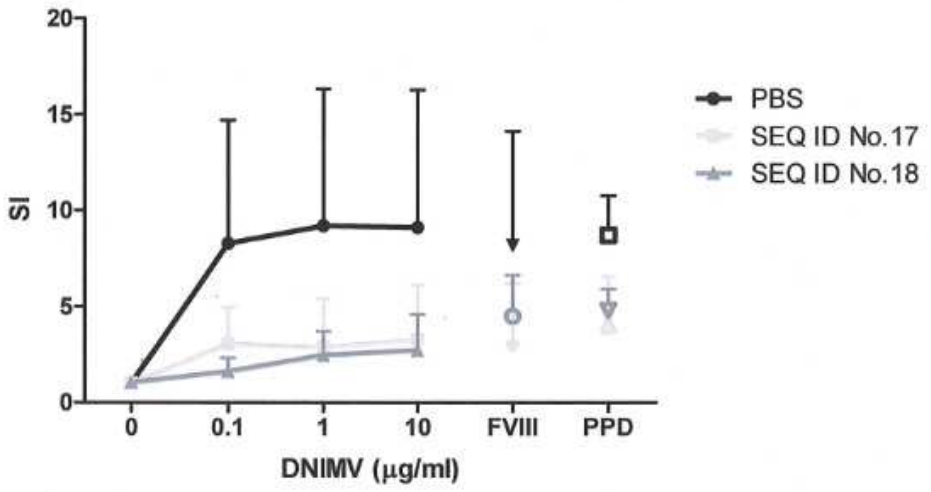


Figura 5

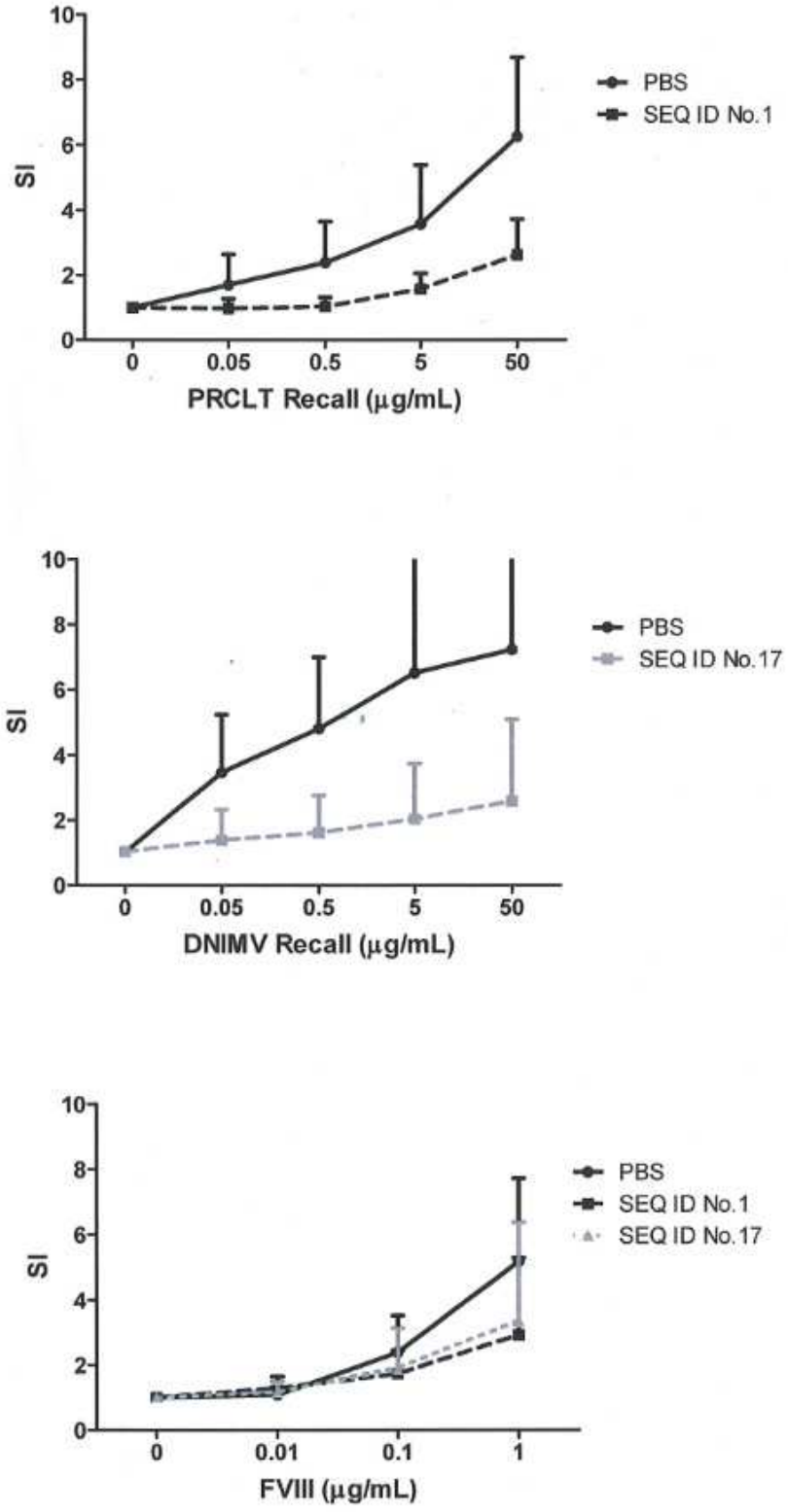

SI
PRCLT Recall (µg/mL)
PBS
SEQ ID No.1
SI
DNIMV Recall (µg/mL)
PBS
SEQ ID No.17
SI
FVIII (µg/mL)
PBS
SEQ ID No.1
SEQ ID No.17

Figura 6

Figura 7a:
Títulos de anticorpos anti-FVIII no dia 28

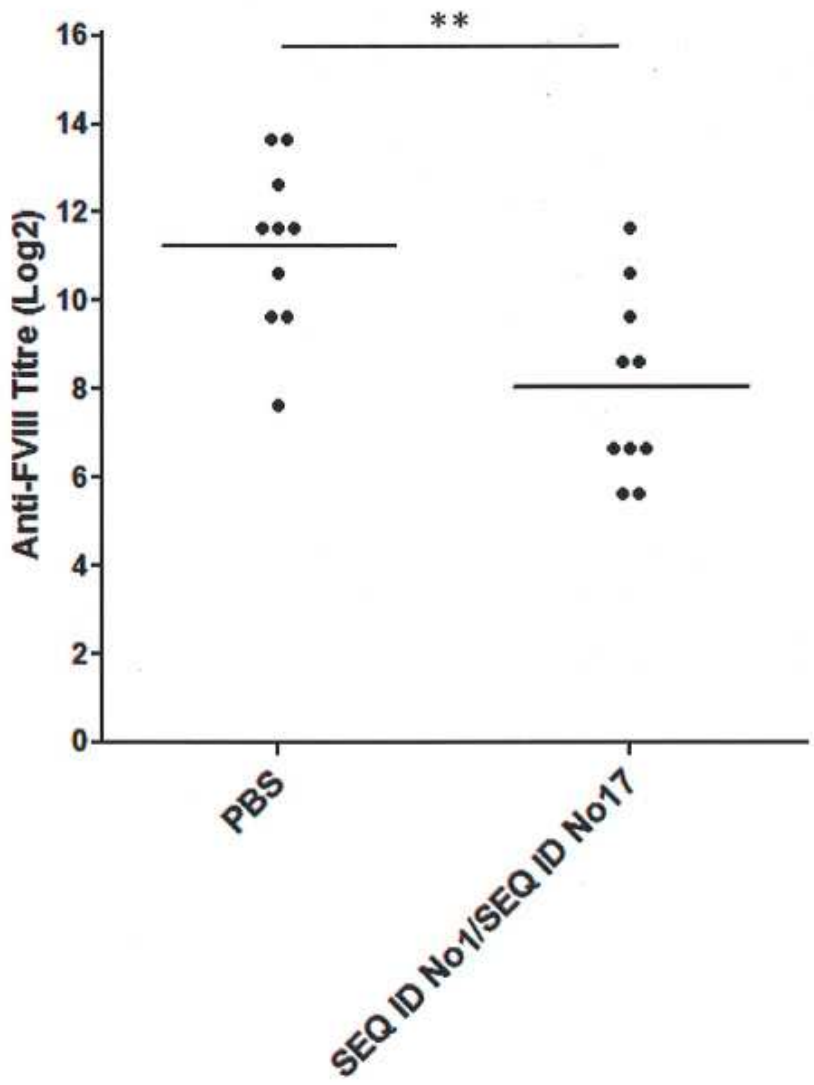
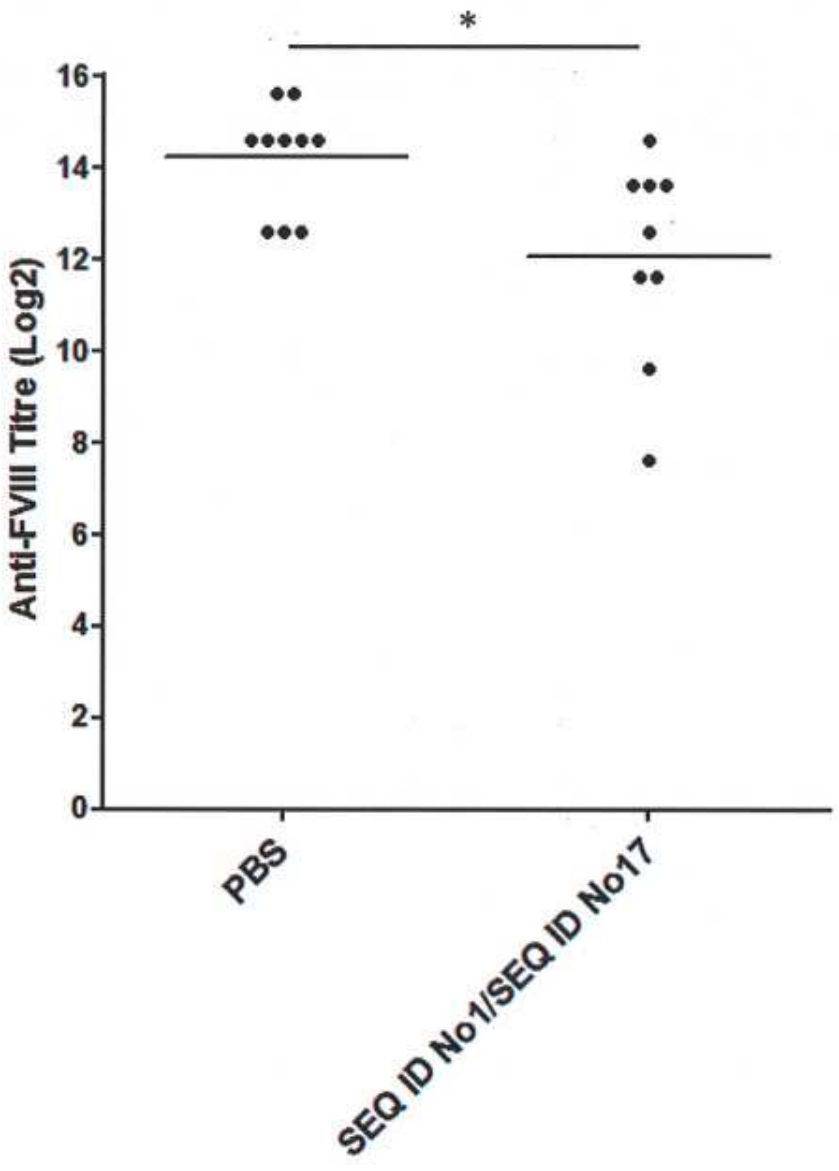


Figura 7b:
Títulos de anticorpos anti-FVIII no dia 56



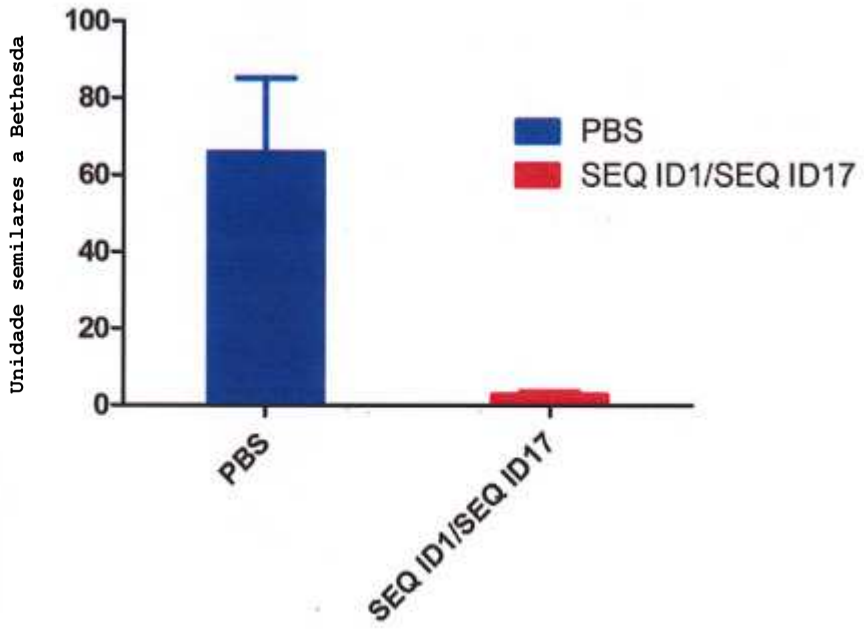

Unidade semilares a Bethesda
100
80
60
40
20
0
PBS
SEQ ID1/SEQ ID17
PBS
SEQ ID1/SEQ ID17

Figura 8

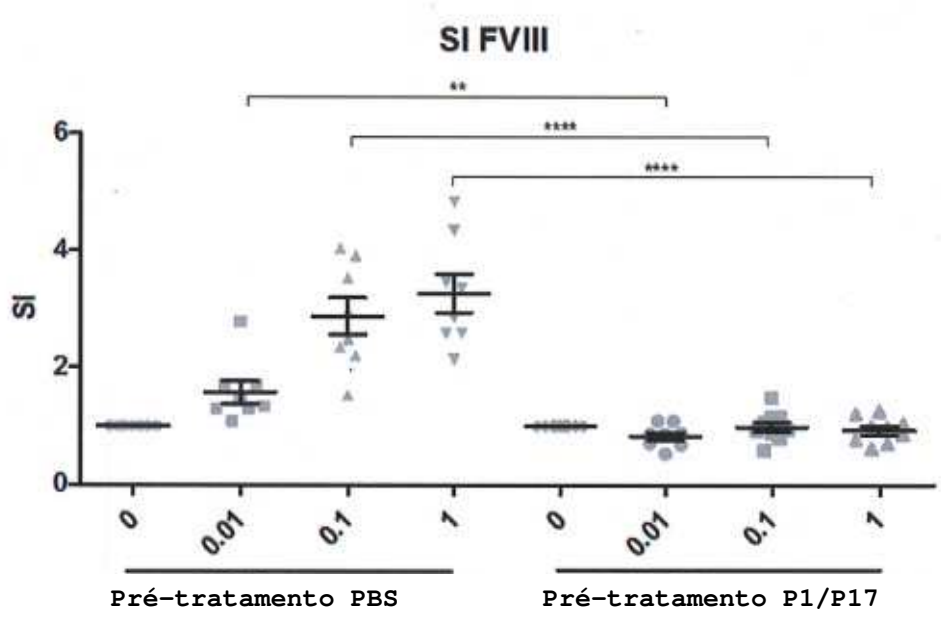

SI FVIII
**
****
****
SI
6
4
2
0
0
0.01
0.1
1
0
0.01
0.1
1
Pré-tratamento PBS
Pré-tratamento P1/P17
Restimulação FVIII (µg/mL)

Figura 9

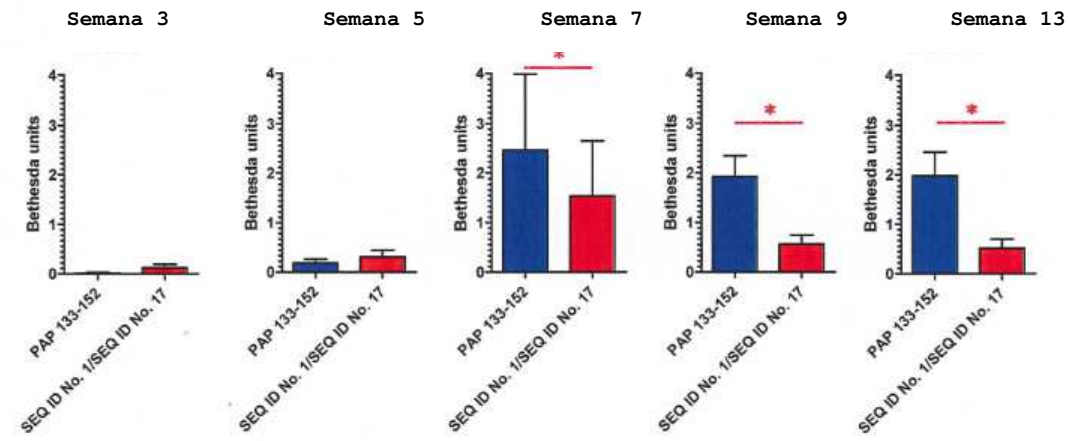

Semana 3
Semana 5
Semana 7
Semana 9
Semana 13
Bethesda units
0
1
2
3
4
*
PAP 133-152
SEQ ID No. 1/SEQ ID No. 17

Figura 10