

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **019370**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.03.31

(21) Номер заявки
201070681

(22) Дата подачи заявки
2008.12.03

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

(54) **ПЕПТИДЫ FVIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ**

(31) **0723712.6**

(32) **2007.12.04**

(33) **GB**

(43) **2010.10.29**

(86) **PCT/GB2008/003996**

(87) **WO 2009/071886 2009.06.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭПИТОП ИНТЕРНЭШНЛ НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Рэйт Дэвид (GB)

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

(56) **WO-A-02060917**

WO-A-03087161

JONES T. D. ET AL.: "Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS: JTH MAY 2005, vol. 3, no. 5, May 2005 (2005-05), pages 991-1000, XP002518538, ISSN: 1538-7933, table 1

SUGIHARA T. ET AL.: "IDENTIFICATION OF PLASMA ANTIBODY EPITOPES AND GENE ABNORMALITIES IN JAPANESE HEMOPHILIA A PATIENTS WITH FACTOR VIII INHIBITOR", NAGOYA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE, NAGOYA DAIGAKU IGAKUBU, NAGOYA, JP, vol. 63, no. 1/02, 1 May 2000 (2000-05-01), pages 25-39, XP008014431, ISSN: 0027-7622, table 2

WO-A-9015615

WO-A-02098454

WO-A-0216410

(57) Настоящее изобретение относится к пептиду, содержащему последовательность срединных остатков, производную FVIII человека, указанный пептид обладает способностью связываться с молекулой МНС II класса без дальнейшего процессирования антигена. Настоящее изобретение также относится к применению таких пептидов для профилактики или суппрессии образования ингибирующих антител при гемофилии А и/или приобретенной гемофилии.

B1**019370****019370 B1**

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пептиду. В частности, изобретение относится к пептидам, получаемым из фактора VIII (FVIII). Эти пептиды могут быть использованы для уменьшения или предотвращения образования ингибирующих антител к фактору VIII, например, при лечении гемофилии А и приобретенной гемофилии.

Предпосылки к созданию изобретения

Гемофилия

Гемофилия принадлежит к группе наследственных заболеваний крови, которая включает гемофилию А, гемофилию В (болезнь Кристмаса) и болезнь Виллебранда.

При гемофилии способность крови к свертыванию значительно снижается вследствие частичного или полного отсутствия необходимых факторов свертывания, что в результате приводит к увеличению времени кровотечения. Гемофилия А представляет собой недостаточность фактора свертывания VIII, тогда как гемофилия В представляет собой недостаточность фактора свертывания IX. При обоих заболеваниях дефектный ген обнаружен на X хромосоме, поэтому заболевание является X-сцепленным. Гемофилия А встречается в пять раз чаще, чем гемофилия В.

Гемофилия представляет собой хроническое наследственное заболевание, которое поражает лиц женского пола, как носителей, и лиц мужского пола, которые наследуют это заболевание. Примерно треть новых диагнозов не имеют семейного анамнеза. По-видимому, это распространено по всему миру и встречается во всех расовых группах. Примерно 6000 человек страдают гемофилией в Соединенном Королевстве.

У людей, страдающих гемофилией, кровотечение продолжается в течение длительного периода времени после травмы. Внешние повреждения, такие как порезы и ссадины, обычно не создают серьезных проблем: зачастую возможно остановить кровотечение путем приложения некоторого давления и закрытия пораженной зоны (например, пластырем).

Главной проблемой является внутреннее кровотечение в суставы, мышцы и мягкие ткани, которые могут происходить спонтанно. Внутреннее кровотечение, таковым являются геморрагии в головной мозг, очень трудно поддаются лечению и могут быть смертельными. Повторное кровоизлияние в суставы вызывает острую боль и может быть причиной артритов и/или длительного повреждения сустава, приводящего к инвалидности.

Лечение гемофилии обычно проводят путем замещения недостающего фактора свертывания. При легкой или умеренной гемофилии инъекции можно делать во время кровотечения (лечение по требованию). Однако при тяжелой гемофилии регулярные профилактические инъекции делают для того, чтобы способствовать свертыванию крови и свести к минимуму вероятность длительного повреждения сустава.

Потенциально серьезным осложнением заместительной терапии факторами свертывания для гемофилии А является появление антител, которые нейтрализуют прокоагуляционную функцию фактора VIII. Ингибиторы фактора VIII появляются приблизительно у 25% больных, страдающих тяжелой гемофилией А. Поскольку у пациентов с врожденной гемофилией А может быть генетическая недостаточность FVIII, синтез ингибиторов является аллоиммунной реакцией на чужеродный белок, вводимый для профилактики или лечения эпизодов кровотечения.

Т-клетки CD4⁺ играют центральную роль в иммунном ответе на FVIII. После захвата антиген-презентирующими клетками (APC) FVIII подвергается протеолитическому разрушению на пептидные фрагменты (Reding et al. (2006) Haemophilia 12 (supp 6) 30-36). Эти пептиды затем презентуются на поверхности APC совместно с молекулами МНС II класса. Затем этот комплекс распознается Т-клеточным рецептором CD4⁺ клеток, специфичным в отношении FVIII. В присутствии соответствующих костимулирующих сигналов это распознавание в конечном счете вызывает синтез антител В-клетками, направляемый CD4⁺ клетками.

Частота случаев образования ингибиторов исходно повышается с количеством проводимых лечебных мероприятий фактором VIII, но выходит на плато после 50-100 дней воздействия. Образование ингибитора гораздо более широко распространено при тяжелой гемофилии, чем при умеренном или легком заболевании, и некоторые молекулярные дефекты, наиболее явные крупные делеции и нонсенс мутации в легкой цепи фактора VIII, по-видимому, предрасполагают к образованию ингибиторов. Такие параметры, как концентрация, тип (очищенный или рекомбинантный) заместительного фактора, и история лечения также влияют на вероятность продукции антител.

Лечение пациентов с гемофилией ингибиторами является существующей сложной задачей. Индукция иммунологической толерантности (ИИТ) с помощью методики десенсибилизации является успешной у некоторых пациентов с аллоантителами против фактора VIII. Этот терапевтический подход требует непрерывного воздействия фактор-заместительной терапией, поэтому представляет собой долгосрочную стратегию.

Хотя ИИТ может быть успешной, значительная часть (около 30%) пациентов не отвечают на ИИТ. Гораздо менее вероятно, что пациенты с высокими титрами ингибиторов будут реагировать на лечение. Другим значительным сопутствующим фактором является возраст, в котором приступают к ИИТ, со значительным снижением результативности, когда пациент старше 20 лет (Hay et al. (2005) Seminars in

Thrombosis and Hemostasis 32:15-21).

В тех случаях, когда лечение ИИТ не имеет успеха, ингибитор в основном сохраняется в течение жизни, и поэтому такие пациенты обычно имеют высокую реактивность, необходимо лечение эпизодов кровотечения препаратами в обход FVIII, такими как концентраты активированного протромбинового комплекса (FEIBA™), и рекомбинантного активированного FVII. Однако применение таких средств связано с побочными эффектами, такими как диссеминированное внутрисосудистое свертывание, острый инфаркт миокарда, легочная эмболия и тромбоз (Acharya and DiMichele (2006) Best Practice & Research Clinical Haematology 19:51-66).

Иммunosuppressирующая терапия иногда применяется у пациентов, которые не отвечают на ИИТ. Лечение включает введение иммуносуппрессирующих лекарственных средств, таких как циклофосфамид, преднизон, азатиоприн и циклоспорин, которые неспецифически направлены на иммунную систему. Это лечение может оказывать побочные эффекты, связанные с общей иммуносупрессией.

Вновь появляется интерес к селективному истощению В-клеток с использованием Rituximab™, гуманизированного моноклонального антитела к CD20 антигену В-клеток. Однако, инфузионные реакции, сывороточная реакция и оппортунистические инфекции встречались у некоторых детей, которых лечили этим лекарственным средством (DiMichele (2007) J. Thromb Haemost 5:143-50).

Приобретенная гемофилия

Приобретенная гемофилия является редким аутоиммунным заболеванием, которое поражает от 1 до 4 людей на миллион. При этом состоянии, у пациентов, родившихся без гемофилии, образуются антитела против одного из факторов свертывания, такого как фактор VIII. Считается, что беременность и аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит и злокачественное заболевание, могут повышать риск развития приобретенной гемофилии. Хотя существуют различия в лежащих в основе иммунологических механизмов, приводящих к их образованию, клинические проявления ингибиторов FVIII, образующихся в ответ на заместительную терапию фактором свертывания и образовавшихся при приобретенной гемофилии, являются сходными.

Процент смертности пациентов с приобретенной гемофилией по оценкам подходит к 25%, частично вследствие объединения приобретенных ингибиторов с тяжелыми осложнениями кровотечения. Лекарственное воздействие на приобретенные аутоантительные ингибиторы основано, прежде всего, на необходимости контролировать или предотвращать острые геморрагические осложнения, которые зачастую угрожают жизни и здоровью, и, вторично, устранить аутоантитела для восстановления нормального свертывания.

Некоторые кровотечения, связанные с низким титром аутоантительных ингибиторов (<5 единиц Бетезда) можно эффективно лечить концентратами FVIII, вводимыми в высоких дозах. Концентрат FVIII свиньи ранее считался крайне важной терапией первой линии, поскольку это была только заместительная терапия, которая обеспечивала благоприятную возможность в действительности измерять постинфузионные уровни коагуляционной активности FVIII в лаборатории. Продукт убрали с рынка в 2004 вследствие контаминации пулов плазмы свиней свиным парвовирусом. В настоящее время наиболее широко используют "обходные" средства, но существуют потенциальные риски тромбогенности и только примерно 80% эффективность для каждого препарата. Обмен плазмой через плазмаферез и экстракорпоральная иммуноадсорбция могут быть необходимы для временного снижения титров ингибитора, достаточного для обеспечения адекватного гемостаза обходными средствами или замещением FVIII.

Устранение аутоантительных ингибиторов зависит от иммуносупрессивных мер, таких как: (1) введение кортикостероидов с 30-50% эффективностью через 3-6 недель; (2) применение цитотоксических и миелосупрессирующих химиотерапевтических средств, например циклофосфамида, циклоспорина, 2-хлордезоксиаденозина; (3) иммуномодулирование внутривенным иммуноглобулином и (4) селективное истощение В-лимфоцитов ритуксимабом. Для пациентов, чувствительных к лечению Ритуксимабом™, может потребоваться одновременное применение стероидов, и рецидивы могут реагировать на повторное лечение.

Таким образом, все способы, доступные в настоящее время для уменьшения продукции аллоантител, связанной с лечением гемофилии А, и продукции антител при приобретенной гемофилии, имеют недостатки. Следовательно, существует необходимость в улучшенных способах, направленных на проблему анти-FVIII антител при гемофилии А и приобретенной гемофилии.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что можно предотвратить образование антител, ингибирующих FVIII, предварительно вызывая толерантность у пациента пептидами, производными FVIII.

Краткое изложение сущности изобретения

Таким образом, настоящее изобретение относится к пептиду, полученному из FVIII, который обладает способностью индуцировать или восстанавливать толерантность к FVIII.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали ряд иммунодоминирующих областей FVIII, которые, предположительно, приводят к образованию HLA-DR2 связывающих пептидов (Таблица 1). Считается, что из этих пептидов области 545-559 и 1788-1803 фактора VIII представляют иммунодоминирующие Т-клеточные эпитопные области в HLA-DR2, ограничивающие Т-клеточный ответ на фактор

VIII человека. Было показано, что лечение мышей этими пептидами приводит к значительной суппрессии иммунологической реакции на фактор VIII.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, содержащему одну из следующих последовательностей срединных остатков:

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYSSSFV
MVTFRNQAS
LRINPQSWV

этот пептид обладает способностью связываться с молекулой MHC II класса без дальнейшего процессирования антигена и распознавания Т-клетками, специфичными в отношении фактора VIII.

Этот пептид, например, может иметь последовательность PRCLTRYSSSFVNME или DNIMVTFRNQASRPY.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащей пептид в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Композиция может содержать множество таких пептидов. В частности, композиция может содержать следующие пептиды: PRCLTRYSSSFVNME и DNIMVTFRNQASRPY.

Композиция может быть в виде набора, в котором отдельно предлагается множество пептидов для раздельного, последовательного, непрерывного или одновременного введения.

Пептид или композиция по изобретению может применяться для суппрессии, снижения или предотвращения образования ингибирующих антител к фактору VIII.

Настоящее изобретение также относится к применению такого пептида или композиции для производства лекарственного средства для суппрессии, уменьшения или предотвращения образования ингибирующих антител к фактору VIII.

Настоящее изобретение также относится к способу суппрессии, предотвращения или уменьшения образования ингибирующих антител к фактору VIII у пациента, который предусматривает стадию введения пациенту такого пептида или композиции.

У пациента может быть недостаточность FVIII. В частности, у этого пациента может быть гемофилия А, и он может проходить, или собирается пройти заместительную терапию фактором VIII.

Альтернативно, у пациента может быть приобретенная гемофилия или риск развития этого заболевания.

Ингибиторы фактора VIII более часто встречаются у лиц, экспрессирующих HLA-DR2. Пациент, подвергающийся лечению способом по настоящему изобретению, следовательно, может быть HLA-DR2 позитивным.

Описание чертежей

Фиг. 1: вторичные иммунные реакции клеток лимфатического узла (LNC) от мышей FVIII+DR2+, подвергнутых первичному воздействию rhFVIII/CFA:

- а) пролиферация LNC на пептиды FVIII 1-6,
- б) пролиферация LNC на пептиды FVIII 7-12,
- с) пролиферация LNC на пептиды FVIII 1, 3 и 11.

Фиг. 2: Характерные примеры клонов FVIII+DR2+ Т-клеточной гибридомы, специфичных для пептидов, производных FVIII.

Фиг. 3: вторичные иммунные реакции для LNC от FVIII-DR2+ мышей, подвергнутых первичному воздействию rhFVIII/CFA.

Фиг. 4: Характерные примеры клонов FVIII-DR2+ Т-клеточной гибридомы, специфичных для FVIII-производных пептидов.

Фиг. 5: FVIII-/- клоны, специфичные для а) DNIMV и б) PRCLT.

Фиг. 6: вторичные иммунные реакции для LNC на FVIII для мышей FVIII+DR2+, получивших 3× внутрибрюшинно пептид до первичного воздействия rhFVIII/CFA.

Фиг. 7: Определение диапазона пептидных эпитопов, способных функционировать в качестве апитопов, с использованием клонов Т-клеточной гибридомы FVIII-DR2+, специфичных в отношении FVIII-производных перекрывающихся пептидов. Исходный пептид обозначен 0. Один аминокислотный сдвиг в направлении N-конца обозначен -1, два аминокислотных сдвига в направлении N-конца обозначены -2 и т.д. Один сдвиг в направлении C-конца обозначен +1 и т.д.

Фиг. 8: Продукция IFN-гамма клетками лимфатического узла в ответ на FVIII у мышей FVIII-DR2+, получавших лечение FVIII-производными пептидами PRCLT, DNIMV или смесью их обоих.

Подробное описание Пептид

Настоящее изобретение относится к пептиду.

Термин "пептид" используется в обычном смысле для обозначения серии остатков, обычно L-аминокислот, соединенных друг с другом обычно пептидными связями между α -амино и карбоксильными группами смежных аминокислот. Этот термин включает модифицированные пептиды и синтетические аналоги пептидов.

Пептид по настоящему изобретению может быть получен с использованием химических способов (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.). Например, пептиды могут быть синтезированы с помощью твердофазных методик (Roberge JY et al. (1995) Science 269: 202-204), расщеплены из смолы и очищены с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (например, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). Может осуществляться автоматизированный синтез, например, с помощью синтезатора пептидов ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями, предложенными производителем.

Альтернативно, пептид может быть получен рекомбинантными методами, или путем расщепления из фактора VIII. Состав пептида может быть подтвержден аминокислотным анализом или секвенированием (например, расщеплением по Эдману).

Для практических целей существуют другие различные характеристики, которые может демонстрировать этот пептид. Например, пептид может растворяться при концентрации, которая позволяет использовать его *in vivo*. Пептид может быть растворимым при концентрациях вплоть до 0,5, 1 или 5 мг/мл.

Также важно, чтобы пептид был достаточно стабилен *in vivo*, чтобы быть терапевтически применимым. Период полужизни этого пептида *in vivo* может составлять по меньшей мере 10, 30 мин, 4 или 24 ч.

Этот пептид также может демонстрировать хорошую биодоступность *in vivo*. Пептид может сохранять конформацию *in vivo*, которая делает возможным его связывание с молекулой МНС на клеточной поверхности без затруднений.

Серединные остатки

При адаптивном иммунном ответе Т лимфоциты способны распознавать внутренние эпитопы белкового антигена. Антиген-презентирующие клетки (APC) поглощают белковые антигены и разрушают их до коротких пептидных фрагментов. Пептид может связываться с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I или II класса внутри клетки и переноситься на поверхность клетки. В случаях презентации на клеточной поверхности совместно с молекулой МНС, пептид может распознаваться Т-клеткой (через Т-клеточный рецептор (TCR)), в этом случае пептид представляет собой Т-клеточный эпитоп.

Таким образом, эпитоп представляет собой пептид, происходящий из антигена, который способен связываться с пептид-связывающим желобком молекулы МНС I или II класса, и может распознаваться Т-клеткой.

Минимальный эпитоп представляет собой самый короткий фрагмент, происходящий из эпитопа, который способен связываться с пептид-связывающим желобком молекулы МНС I или II класса, и может распознаваться Т-клеткой. Для заданной иммуногенной области характерна возможность образования "вложенного множества" перекрывающихся пептидов, которые действуют как эпитопы, каждый из которых содержит минимальный эпитоп, но отличается своими фланкирующими областями.

К тому же возможно идентифицировать минимальный эпитоп для конкретного сочетания молекулы МНС:Т-клетки путем определения ответа на усеченные пептиды. Например, если ответ получен на пептид, содержащий остатки 1-15 в перекрывающейся библиотеке, множества, которые усечены с обоих концов (т.е. 1-14, 1-13, 1-12 и т.д. и 2-15, 3-15, 4-15 и т.д.), могут быть использованы для идентификации минимального эпитопа.

Настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим последовательность "серединных остатков" FVIII. С помощью алгоритмов HLA-DR2 связывания предполагается, что эти последовательности срединных остатков представляют или содержат минимальный эпитоп для каждой области.

Апиптопы

Авторы настоящего изобретения ранее установили, что существует связь между способностью пептида связываться с молекулой МНС I или II класса, и презентацией Т-клетке без дальнейшего процессирования антигена, и способностью пептида индуцировать толерантность *in vivo* (WO 02/16410). Если пептид является слишком длинным для связывания с пептид-связывающим желобком молекулы МНС без дополнительного процессинга (например, тримминга), или связывается в неподходящей конформации, тогда он не будет вызывать толерантности *in vivo*. С другой стороны, если пептид соответствующего размера и конформации для связывания непосредственно с пептид-связывающим желобком МНС и презентации Т-клеткам, то этот пептид предположительно может подходить для индукции толерантности.

Таким образом, возможно исследовать способность пептида индуцировать толерантность путем исследования, может ли он связываться с молекулой МНС I или II класса и презентироваться Т-клеткам без

дополнительного процессирования антигена *in vitro*.

Пептиды по настоящему изобретению являются апитопами (независимые от процессирования антигена эпитОПЫ), в том смысле, что они способны связываться с молекулой МНС II класса и стимулировать ответ от Т-клеток, специфичных в отношении фактора VIII, без дополнительного процессирования антигена. Такие апитопы, предположительно, могут вызывать толерантность к FVIII, по способу, основанному на правилах, описанных в WO 02/16410.

Пептид по настоящему изобретению может быть любой длины, при которой он способен связываться с молекулой МНС I или II класса без дополнительного процессирования. Обычно пептид по настоящему изобретению способен связываться с МНС II класса.

Длина пептидов, которые связываются с молекулами МНС I класса, обычно составляет от 7 до 13, чаще от 8 до 10 аминокислот. Связывание пептида стабилизируется с двух его концов контактированием между атомами в главной цепи пептида и константными участками в пептид-связывающем желобке всех молекул МНС I класса. На обоих концах желобка имеются константные участки, которые связывают амино и карбоксиконцы пептида. Модификациями является длина пептида, приспособленная путем образования петли в пептидном скелете, зачастую при остатках пролина или глицина, что дает необходимую гибкость.

Длина пептидов, которые связываются с молекулами МНС II класса, обычно составляет от 8 до 20 аминокислот, чаще от 10 до 17 аминокислот, и может быть больше (например, вплоть до 40 аминокислот). Эти пептиды лежат в растянутой конформации вдоль пептид-связывающего желобка МНС II, который (в отличие от пептид-связывающего желобка МНС I класса) открыт с обоих концов. Пептид удерживается на месте главным образом посредством контактов атомов основной цепи с консервативными остатками, которые выстилают пептид-связывающий желобок.

Пептидные последовательности

Первый аспект настоящего изобретения относится к пептиду, содержащему одну из следующих последовательностей срединных остатков:

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYSSFV
MVTFRNQAS
LRINPQSWV.

Например, пептиды могут содержать одну из следующих последовательностей срединных остатков:

IARYIRLHP
LTRYSSFV
MVTFRNQAS
LRINPQSWV.

В частности, пептиды могут содержать одну из следующих последовательностей срединных остатков:

LTRYSSFV
MVTFRNQAS.

Этот пептид может содержать одну из последовательностей срединных остатков, вместе с дополнительными фланкирующими последовательностями на N и/или С конце, при условии, что полученный в результате пептид способен связываться с молекулой МНС II класса без дополнительного процессирования антигена.

Фланкирующие N и/или С концевые последовательности могут происходить из последовательностей, фланкирующих последовательности срединных остатков в FVIII человека.

Например, пептид может быть выбран из следующей группы:

SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHNY
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYSSFVNME
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRINPQSWVHQIA.

Уже известно, что некоторые FVIII-производные пептиды являются апитопами (например, PRCLTRYSSFVNME и DNIMVTFRNQASRPY). Помимо этих пептидов могут быть другие, которые

имеют такую же последовательность срединных остатков, но которые отличаются одним или несколькими фланкирующими остатками.

Для того, чтобы это проверить, может быть получена панель перекрывающихся пептидов. Обычно кластер пептидов в панели способен вызывать иммунную реакцию, поскольку они содержат минимальный эпитоп. Среди этих пептидов можно установить, ведет ли себя этот пептид как апитоп, путем исследования способности этого пептида связываться с молекулами МНС II класса и стимулирования соответствующих Т-клеток в системе презентации без процессирования антигена.

Пептиды, показанные в следующей таблице, могут быть протестированы по их способности действовать в качестве апитопов:

SLYISQFIIMYSLDG
LYISQFIIMYSLDGK
RQKFSSLYISQFIIM
QKFSSLYISQFIIMY
KFSSLYISQFIIMYS
FSSLYISQFIIMYSL
SSLYISQFIIMYSLD
YISQFIIMYSLDGKK
ISQFIIMYSLDGKKW
SQFIIMYSLDGKKWQ
QFIIMYSLDGKKWQT
FIIMYSLDGKKWQTY
IARYIRLHPHYSIR
IIARYIRLHPHYSI
PIIARYIRLHPHYS
PPIIARYIRLHPHY
NPPIIARYIRLHPH
FNPPIIARYIRLHPT
IFNPPIIARYIRLHP
LIIFKNQASRPYNIY
LLIIFKNQASRPYNI
TLLIIFKNQASRPYN
DTLLIIFKNQASRPY
GDLLLLIIFKNQASRP
VGDLLLLIIFKNQASR
EVGDLLLLIIFKNQAS
KSDPRCLTRYSSFV
SDPRCLTRYSSFVN
DPRCLTRYSSFVNM
PRCLTRYSSFVNME
RCLTRYSSFVNMER
CLTRYSSFVNMERD
LTRYSSFVNMERDL

EVEDNIMVTFRNQAS
VEDNIMVTFRNQASR
EDNIMVTFRNQASRP
DNIMVTFRNQASRPY
NIMVTFRNQASRPYS
IMVTFRNQASRPYSF
MVTFRNQASRPYSFY
LRIRHPQSWVHQIALR
YLRIRHPQSWVHQIAL
RYLRIRHPQSWVHQIA
TRYLRIRHPQSWVHQI
LTRYLRIRHPQSWVHQ
LLTRYLRIRHPQSWVH
PLLTRYLRIRHPQSWV

Также, может быть, что пептиды, немного длиннее или короче, чем эти 15-мерные пептиды, приведенные в таблицах, представленных выше, действуют как апитопы и способны вызывать толерантность у пациента к фактору VIII. Длина пептида, например, может составлять от 10 до 25 аминокислот, в частности от 12 до 18 аминокислот.

APIPS

Известны различные системы презентации, независимые от процессирования антигена (APIPS), в том числе:

- a) фиксированные APC (с антителами к CD28, или без них);
- b) липидные мембраны, содержащие молекулы МНС I или II класса (с антителами к CD28, или без них); и
- c) очищенные природные или рекомбинантные МНС в виде связанных с планшетом (с антителами к CD28, или без них).

Все эти системы способны к презентации антигена совместно с молекулой МНС, но не способны к процессированию антигена. Во всех этих системах функция процессирования либо отсутствует, либо блокирована. Это делает возможным исследование, может ли пептид связываться с молекулой МНС I или II класса и быть презентируемым Т-клеткам без дополнительного процессирования антигена.

Применение фиксированных APC для исследования Т-клеточных ответов хорошо известно в данной области, например в исследованиях для установления минимального эпитопа в полипептиде, путем определения реакции на усеченные пептиды (Fairchild et al. (1996) Int. Immunol. 20 8:1035-1043). APC могут быть фиксированы с использованием, например, формальдегида (обычно параформальдегида) или глутаральдегида.

Липидные мембраны (которые могут представлять собой плоские мембраны или липосомы) могут быть получены с использованием искусственных липидов или могут представлять собой плазматические мембраны/микросомальные фракции из APC.

При использовании, APIPS можно наносить на лунки планшета для тканевых культур. Затем добавляют пептидные антигены, и связывание пептида с МНС частью APIPS определяют путем добавления выбранных линий Т-клеток или клонов. Активация Т-клеточной линии или клона может быть измерена любыми известными из уровня техники способами, например, посредством включения ³H тимидина или секреции цитокинов.

Фактор VIII.

Пептид по настоящему изобретению может быть получен из фактора VIII.

Фактор VIII участвует во внутренней системе коагуляции крови; фактор VIII является кофактором для фактора IXa, который в присутствии Ca²⁺ и фосфолипидов превращает фактор X в активированную форму Xa.

Ген фактора VIII продуцирует два транскрипта альтернативного сплайсинга. Вариант транскрипта 1 кодирует большой гликопротеин, изоформу a, который циркулирует в плазме и связывается с фактором Виллебранда в нековалентный комплекс. Этот белок проходит стадии многократных расщеплений. Вариант транскрипта 2 кодирует предполагаемый малый белок, изоформу b, который состоит, прежде всего, из фосфолипид-связывающего домена фактора VIIIc. Этот связывающий домен является необходимым для коагулирующей активности.

Полная последовательность гена фактора VIII человека в 186000 пар оснований была определена в середине 1980-х (Gitschier et al. (1984) Nature 312 326-330). В это же время клоны ДНК, кодирующей полную последовательность в 2351 аминокислоту, использовали для получения биологически активного

фактора VIII в культивированных клетках млекопитающих (Wood et al. (1984) Nature 312:330-337). Полная последовательность 2351 аминокислоты для фактора VIII человека приведена в SEQ ID NO:1.

Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены из фактора VIII. Этот пептид, например, может состоять из непрерывной последовательности аминокислот из последовательности фактора VIII. Этот пептид может быть получен в результате расщепления последовательности фактора VIII.

Пептид может иметь одну или более мутаций, таких как добавления, замены или делеции последовательности дикого типа, при условии, что пептид сохраняет способность связываться с пептид-связывающим желобком молекулы МНС без дополнительного процессирования антигена, и может распознаваться релевантными Т-клетками. По длине этого пептида может, например, быть пять, три, две или одна мутация, при сравнении с последовательностью дикого типа.

Намеренные аминокислотные замены могут быть сделаны на основе сходства в полярности, заряде, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природе остатков, при условии сохранения связывающей способности пептида.

Консервативные замены могут быть сделаны, например, в соответствии с приведенной ниже таблицей. Аминокислоты в том же блоке во второй колонке и предпочтительно в той же строке в третьей колонке могут быть замещены одна на другую:

АЛИФАТИЧЕСКИЕ	Неполярные	G A P
		I L V
	Полярные - незаряженные	C S T M
		N Q
	Полярные - заряженные	D E
		K R
АРОМАТИЧЕСКИЕ		H F W Y

Настоящее изобретение также охватывает гомологичные замены (как замены, так и замещения используются в контексте настоящего изобретения для обозначения замены существующего аминокислотного остатка альтернативным остатком), которые могут иметь место, т.е. замена подобной на подобную, например, основную на основную, кислую на кислую, полярную на полярную и т.д. Также могут иметь место негомологичные замены, т.е. остатки одного класса на остатки другого класса, или альтернативно включающую включение неприродных аминокислот, таких как орнитин (здесь и далее обозначено Z), диаминомасляная кислота орнитин (здесь и далее обозначено B), норлейцин орнитин (здесь и далее обозначено O), пиридилаланин, тиенилаланин, нафтилаланин и фенилглицин.

Замены также могут быть сделаны путем включения неприродных аминокислот; альфа* и альфа-двузамещенных* аминокислот, N-алкил аминокислот*, молочной кислоты*, галид-производных природных аминокислот, таких как трифтортирозин*, p-Cl-фенилаланин*, p-Br-фенилаланин*, p-I-фенилаланин*, L-аллил-глицин*, β-аланин*, L-α-аминомасляная кислота*, L-γ-аминомасляная кислота*, L-α-аминоизомасляная кислота*, L-ε-аминокапроновая кислота*, 7-аминогептановая кислота*, L-метионинсульфон*, L-норлейцин*, L-норвалин*, p-нитро-L-фенилаланин*, L-гидроксипролин*, L-тиопролин*, метилпроизводные фенилаланина (Phe), такие как 4-метил-Phe*, пентаметил-Phe*, L-Phe (4-амино)[#], L-Tyr (метил)*, L-Phe (4-изопропил)*, L-Tic (1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота)*, L-диаминопропионовая кислота[#] и L-Phe (4-бензил)*. Обозначение * было использовано для цели, рассмотренной выше (относительно гомологичной или негомологичной замены), для обозначения гидрофобной природы производного, тогда как [#] использовали для обозначения гидрофильной природы производного, ^{##} указывает на амфипатические характеристики.

Дальнейшая форма изменения включает наличие одного или нескольких аминокислотных остатков в пептоидной форме, хорошо понятной специалистам в данной области. Во избежание неоднозначности толкования, "пептоидная форма" используется в отношении варианта аминокислотных остатков, где α-углеродная замещающая группа находится на атоме азота этого остатка, не на α-углероде. Способы получения пептидов в пептоидной форме известны из уровня техники, например, Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 и Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

Толерантность

Т-клеточные эпитопы играют основную роль в адаптивном иммунном ответе на любой антиген, собственный или чужеродный. Основная роль, которую играют Т-клеточные эпитопы при состояниях гиперчувствительности (которые включают аллергию, аутоиммунные заболевания и отторжение трансплантата), была показана посредством использования экспериментальных моделей. Возможно индуцировать воспалительные или аллергические заболевания путем введения синтетических пептидов (на основе структуры Т-клеточных эпитопов) в сочетании с адьювантом.

Напротив, было показано, что возможно индуцировать иммунологическую толерантность в отношении конкретных антигенов путем введения пептидных эпитопов в растворимой форме. Было показано, что введение растворимых пептидных антигенов является эффективным средством ингибирования забо-

левания при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (EAE - модель рассеянного склероза (PC)) (Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); и в экспериментальных моделях артрита, диабета и увеитинита (обзор представлен Anderton и Wraith (1998), как указано выше). Это также было продемонстрировано как средство лечения текущего заболевания при EAE (Anderton и Wraith (1998) как указано выше).

Толерантность представляет собой неотвечаемость на антиген. Толерантность к собственным антигенам является жизненно-важной особенностью иммунной системы, при ее утрате результатом может быть аутоиммунное заболевание. Адаптивная иммунная система должна поддерживать способность реагировать на огромное множество инфекционных агентов, при этом избегая воздействия на собственные антигены, содержащиеся в собственных тканях. В большой степени это контролируется чувствительностью незрелых Т-лимфоцитов к апоптотической клеточной гибели в тимусе (центральная толерантность). Однако, не все собственные антигены распознаются в тимусе, поэтому гибель аутореактивных тимоцитов остается неполной. Следовательно, также существуют механизмы, посредством которых толерантность может быть приобретена зрелыми аутореактивными Т-лимфоцитами в периферических тканях (периферическая толерантность). Обзор механизмов центральной и периферической толерантности приведен Anderton et al. (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

При гемофилии А у пациентов имеется дефект гена фактора VIII. Это означает, что фактор VIII не распознается иммунной системой как «собственный» антиген. При введении фактора VIII во время заместительной терапии фактора свертывания, следовательно, аллоиммунный ответ генерируется на чужеродный белок, что приводит к образованию антител, ингибирующих FVIII.

Пептиды по настоящему изобретению способны индуцировать толерантность к фактору VIII таким образом, что при терапевтическом введении FVIII он не индуцирует иммунный ответ, и ингибиторы FVIII не образуются.

Приобретенная гемофилия представляет собой аутоиммунное заболевание, при котором нарушается толерантность к фактору VIII. В этом случае, пептиды по настоящему изобретению можно вводить для восстановления толерантности к этому собственному белку и уменьшения патологической иммунной реакции.

Толерантность может быть результатом или характеризоваться индукцией анергии по меньшей мере у части CD4+ Т-клеток. Для активации Т-клеток пептид должен связаться с "профессиональной" APC, способной передавать Т-клеткам два сигнала. Первый сигнал (сигнал 1) передается комплексом МНС-пептид на клеточной поверхности APC и принимается Т-клеткой через TCR. Второй сигнал (сигнал 2) передается костимулирующими молекулами на поверхности APC, такими как CD80 и CD86, и принимаются CD28 на поверхности Т-клетки. Считается, что когда Т-клетка получает сигнал 1 в отсутствие сигнала 2, она не активируется, и, в действительности, становится анергичной. Анергичные Т-клетки являются резистентными к последующей антигенной стимуляции и могут быть способными суппрессировать другие иммунные реакции. Считается, что анергичные Т-клетки вовлечены в опосредование Т-клеточной толерантности.

Не желая привязываться к теории, авторы настоящего изобретения предположили, что пептиды, для которых требуется процессирование перед тем, как они могут быть презентируемы в сочетании с молекулами МНС, не индуцируют толерантность, поскольку они должны удерживаться зрелыми антиген-презентирующими клетками. Зрелые антиген-презентирующие клетки (такие как макрофаги, В-клетки и дендритные клетки) способны к процессированию антигена, но также к передаче обоих сигналов 1 и 2 к Т-клетке, приводя к Т-клеточной активации. Апитопы, с одной стороны, будут способны связываться с МНС II класса на незрелых APC. Следовательно, они будут презентированы Т-клеткам без костимуляции, приводя к анергии Т-клеток и толерантности.

Разумеется, апитопы также способны связываться с молекулами МНС на клеточной поверхности зрелых APC. Однако иммунная система содержит гораздо большее количество незрелых, чем зрелых APC (было высказано предположение, что активировано менее 10% дендритных клеток. Summers et al. (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). Отсутствие какого-либо отношения к апитопу, следовательно, будет анергией/толерантностью, а не активацией.

Индукцию толерантности к FVIII можно контролировать *in vivo*, определяя снижение уровня:

- (i) FVIII ингибирующих антител;
- (ii) Т-клеток CD4 + , специфичных к FVIII;
- (iii) В-клеток, способных секретировать FVIII ингибирующие антитела, с помощью способов, известных из уровня техники.

Было показано, что когда толерантность индуцируется введением пептида, способность антиген-специфичных CD4+ Т-клеток к пролиферации снижена. Также, продукция IL-2, IFN- γ и продукция IL-4 этими клетками регулируется по типу отрицательной обратной связи, а продукция IL-10 повышается. Было показано, что нейтрализация IL-10 у мышей в состоянии толерантности, индуцированной пептидом, восстанавливает полностью восприимчивость к заболеванию. Предположили, что популяция регуляторных клеток персистирует в состоянии толерантности, которая продуцирует IL-10 и опосредует им-

мунологическую регуляцию (Burkhart et al. (1999) Int. Immunol. 11:1625-1634).

Индукция толерантности, следовательно, также может контролироваться с помощью различных способов, включающих:

- (а) индукцию анергии у Т-клеток CD4⁺ (которая может быть определена путем повторной стимуляции с использованием FVIII *in vitro*);
- (b) изменения популяции Т-клеток CD4⁺, в том числе (i) снижение пролиферации;
- (ii) отрицательная регуляция продукции IL-2, IFN- γ и IL-4 и
- (iii) повышение продукции IL-10.

В контексте настоящего изобретения термин "вызывающий толерантность" означает способность индуцировать толерантность.

Композиция

Настоящее изобретение также относится к композиции, например фармацевтической композиции, содержащей пептид в соответствии с изобретением.

Этот пептид может содержать большое число пептидов, например два, три, четыре, пять или шесть пептидов по изобретению.

Пептиды по изобретению могут содержать различные минимальные эпитопы. Например, пептиды могут содержать минимальный эпитоп из пептидов, приведенных в табл. 1.

Композиция может содержать пептиды PRCLTRYSSFNME и DNIMVTFRNQASRPY.

Композиция по настоящему изобретению может быть для профилактического или терапевтического применения.

При введении для профилактического применения эта композиция может уменьшать или предотвращать индукцию иммунного ответа на FVIII. Уровень иммунного ответа является меньшим, чем было бы получено у пациента, не получавшего лечения этой композицией. Термин "уменьшать" указывает на то, что наблюдается частичное уменьшение иммунного ответа, например 50, 70, 80 или 90% уменьшение ответа, который наблюдался бы у пациента, не получившего лечения этой композицией (или ответа, наблюдаемого у пациента, не получавшего лечения на протяжении того же промежутка времени). Термин "предотвращать" указывает на то, что определяемого иммунного ответа на FVIII не наблюдается.

При введении для терапевтического применения композиция может суппрессировать уже имеющуюся иммунную реакцию на FVIII. Термин "суппрессия" указывает на снижение уровня имеющегося иммунного ответа, по сравнению с уровнем до введения пептида, или уровнем, который наблюдался бы в тот же момент времени без осуществления лечения.

Лечение композицией по настоящему изобретению может вызывать снижение уровней одного или всего из следующего:

- (i) антител, ингибирующих FVIII;
- (ii) CD4⁺ Т-клеток, специфичных в отношении FVIII;
- (iii) В-клеток, секретирующих ингибирующие антитела в отношении FVIII.

Выявление всех этих факторов можно осуществить с помощью любого способа, известного из уровня техники, такого как ELISA, FACS и т.д.

Лечение с помощью композиции по настоящему изобретению также альтернативно может вызывать анергию CD4⁺ Т-клеток, специфичных в отношении FVIII. Анергия может быть выявлена, например, путем повторной стимуляции с использованием FVIII *in vitro*.

Важно принять во внимание, что не все иммунные реакции на FVIII являются патогенными. Неингибирующие анти-FVIII антитела могут быть обнаружены у пациентов с гемофилией без ингибиторов (Moreau et al. (2000) Blood 95:3435-41) и приблизительно у 15% здоровых доноров крови (Algiman et al. (1992) 89:3795-9).

Ингибиторы FVIII могут быть выявлены с помощью Бетезда-анализа свертывания с модификацией по Неймегену, в котором тестируют способность плазмы пациента инактивировать FVIII в нормальной плазме. Единица Бетезда определяется как количество антител, которое нейтрализует 50% активности плазменного FVIII, и титры 0,6 BU или больше означают присутствие антител.

Ингибиторы обычно классифицируются как низкого титра, если уровень равен <5 BU и высокого титра, если ≥ 5 BU.

Уровень циркулирующих ингибирующих антител к FVIII может быть снижен до 90, 75, 50, 20, 10, 5% от уровня антител, который мог наблюдаться у пациента в отсутствие лечения.

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

Пептиды и композиции по настоящему изобретению могут повышать количество или долю терапевтически вводимого FVIII, доступного для облегчения свертывания у пациента. Это происходит вследствие снижения ингибиторов FVIII, которые могут эффективно удалять часть FVIII в результате проявления их терапевтической функции. Пептид или композиция по изобретению могут увеличивать количество доступного FVIII, например, на 10, 25, 50 75 или 100%.

Пептиды и композиции по изобретению, таким образом, могут снижать количество FVIII, которое

должно быть введено для облегчения свертывания у пациента.

Технология получения лекарственных средств

Композиция может быть получена в инъекруемом виде, либо в виде жидкого раствора, либо суспензии; также может быть получена твердая форма, подходящая для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгирован, или пептиды инкапсулированы в липосомах. Активные ингредиенты могут быть перемешаны с эксципиентами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. Подходящими эксципиентами, например, являются вода, физиологический раствор (например, фосфат-буферный физиологический раствор), декстроза, глицерин, этанол или подобное, и их сочетания.

Кроме того, при желании, композиция может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы и/или pH буферные вещества. Буферные соли включают фосфат, цитрат, ацетат. Соляная кислота и/или гидроксид натрия могут быть использованы для установления pH. Для стабилизации могут быть использованы дисахариды, такие как сахароза или трегалоза.

Если композиция содержит большое количество пептидов, относительное соотношение пептидов приблизительно может быть равным. Альтернативно, относительные соотношения каждого пептида могут быть изменены, например, чтобы сфокусировать толерогенный ответ на конкретной разновидности Т-клеток, или если обнаружено, что один пептид работает лучше, чем другие в конкретных типах HLA.

После получения композицию можно вводить в стерильный контейнер, который затем герметично закрывают и хранят при низкой температуре, например 4°C, или композиция может быть лиофилизирована.

Удобно получать композицию в виде лиофилизированного (высушенного замораживанием) порошка. Лиофилизирование позволяет осуществлять длительное хранение в стерильной форме.

Процессы лиофилизации хорошо известны из уровня техники, см., например, <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Перед лиофилизацией обычно используют наполнители, такие как маннитол, декстран или глицин.

Композицию можно вводить удобным способом, таким как пероральный, внутривенный (в случае водорастворимой), внутримышечный, подкожный, подязычный, интраназальный, внутрикожный, или суппозиториями, или имплантацией (например, используя молекулы медленного высвобождения).

Композицию предпочтительно можно вводить интраназальным, подкожным или внутрикожным путем.

Пептид или композиция по изобретению могут быть использованы для лечения пациента человека. Пациент может страдать гемофилией А, в частности, тяжелой гемофилией А. У пациента может быть генетическая недостаточность FVIII. У пациента может быть приобретенная гемофилия. У пациента могут быть ингибирующие анти-FVIII антитела.

Пациент может проходить или готовиться проходить заместительную коагуляционную терапию с использованием FVIII.

Пациент может проходить или готовиться проходить генную терапию геном FVIII.

У пациента может быть HLA-гаплотип, который связан с предрасположенностью к образованию ингибирующих анти-FVIII аллоантител или аутоантител. Пациент может экспрессировать HLA-DR2. Способы определения HLA гаплотипа у индивидуума известны из уровня техники.

Обычно лечащий врач определит фактическую дозу, которая будет наиболее подходящей для конкретного пациента, и эта доза будет варьировать в зависимости от возраста, массы тела и реакции конкретного пациента.

В предпочтительном варианте осуществления может следовать протокол «повышения дозы», при котором многократные дозы вводят пациенту в возрастающих концентрациях. Такой подход был использован, например, для пептидов фосфолипазы A2 в иммунотерапевтических применениях против аллергии на пчелиный яд (Müller et al. (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 и Akdis et al. (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

Наборы

Удобно, если композиция содержит большое количество пептидов, их можно вводить вместе, в форме смешанной композиции или коктейля. Однако могут быть обстоятельства, при которых предпочтительно вводить пептиды по отдельности в виде набора для одновременного, раздельного, последовательного или комбинированного введения.

Набор также может содержать средства для перемешивания и/или введения (например, испаритель для интраназального введения; или шприц и иглу для подкожного/внутрикожного дозирования). Набор также может содержать инструкции по применению.

Фармацевтическая композиция или набор по изобретению могут быть использованы для лечения и/или профилактики заболевания.

В частности, композиция/набор могут быть использованы для лечения и/или профилактики гемофилии А или приобретенной гемофилии.

Гемофилия А

Причиной гемофилии А (классической гемофилии) является недостаточность фактора VIII.

По оценкам, заболеваемость гемофилией А составляет 1 на 10000 лиц мужского пола, тогда как гемофилия В, по оценкам, встречается у одного на 40000 лиц мужского пола. Приблизительно 1 женщина на 5000 является носителем гемофилии А, и 1 на 20000 является носителем гемофилии В.

Гемофилию обычно делят на три класса: тяжелая, умеренная и легкая, исходя из уровня фактора свертывания в крови. При тяжелой гемофилии имеется менее 1% нормального фактора свертывания. Степень тяжести обычно бывает сопоставимой из поколения в поколение.

Вопреки широко распространенному мнению незначительные порезы и раны обычно не представляют угрозы для больных гемофилией. Скорее наибольшая опасность исходит от спонтанного кровотечения, которое может происходить в суставах и мышцах. Чаще всего это происходит в период быстрого роста, обычно в возрасте от 5 до 15 лет.

Повторные спонтанные кровоизлияния в суставы могут вызвать артрит, и примыкающие мышцы становятся ослабленными. Давление на нервы, вызванное накоплением крови, может в результате приводить к боли, онемению и временной неспособности осуществлять движение в области поражения.

Гемофилию А обычно диагностируют с помощью исследования крови для определения эффективности свертывания и для исследования отклонений в уровнях факторов свертывания.

Разработка очищенных факторов свертывания в 1970-х, выделенных из донорской крови, значительно улучшила долгосрочную перспективу для больных гемофилией. Больные гемофилией от легкой до умеренной степени могут применять лечение с использованием FVIII на временной основе, тогда как для больных гемофилией тяжелой степени может потребоваться регулярное бессрочное лечение.

Ранее пациентам вводили концентраты фактора VIII, собранного от тысяч доноров плазмы. Это приводит к значительным проблемам загрязнения вирусными патогенами, в частности, вирусом иммунодефицита человека и вирусами гепатита. Методики очистки моноклональных антител, инактивация нагреванием и обработка вирулицидными детергентами сделали концентраты, производные плазмы, относительно безопасными.

Технология рекомбинантных ДНК представила серию синтетических продуктов, таких как Recombinate™ и Kogenate™. Kogenate получен с использованием клеток почки детеныша хомячка, экспрессирующих фактор VIII человека. Полученный в результате фактор является высокоочищенным, устраняющим любую возможность передачи вируса из плазмы.

Пептид или композицию по настоящему изобретению можно вводить до и/или во время заместительной терапии фактором VIII.

Гемофилия А является идеальной патологической мишенью для генной терапии, поскольку i) она вызывается мутациями в одном идентифицированном гене, ii) небольшое повышение уровней фактора свертывания *in vivo* может превратить тяжелую гемофилию в более легкое заболевание, и iii) проводимая в настоящее время заместительная терапия считается близкой к оптимальной. Также существует широкий диапазон безопасности, если имеется "промах" желаемого уровня коагуляционной активности.

К сожалению, к настоящему времени перспективы генной терапии как способа лечения гемофилии не были реализованы, прежде всего, вследствие трудностей в поиске системы доставки гена, которая является достаточно неиммуногенной, чтобы позволить осуществлять долговременную экспрессию фактора свертывания.

Пептиды по настоящему изобретению также были бы подходящими для индукции толерантности у пациента до генной терапии фактором VIII и/или регулирования образования ингибиторов FVIII у пациента после генной терапии.

Приобретенная гемофилия

Приобретенная гемофилия характеризуется наличием аутоантительных ингибиторов против FVIII у индивидуумов ранее с нормальной коагуляцией. Это редкое заболевание, с приблизительной частотой возникновения 1-3 на миллион популяции в год. Процент смертности, связанный с приобретенными аутоантительными ингибиторами, достигает 25% по сравнению со значительно более низким уровнем смертности у больных с аллоантителами.

По сравнению с пациентами, у которых аллоантительный ингибитор, приобретенная гемофилия характеризуется: (1) более тяжелым профилем кровотечения; (2) более высокой частотой возникновения в популяции пожилых людей; (3) возникновением в сочетании с поддающимися определению лежащими в основе аутоиммунными заболеваниями, лимфопролиферативными или злокачественными солидными опухолями, беременностью и применением некоторых антибиотиков, таких как пенициллин и сульфонамиды, приблизительно в 50% случаев; и (4) *in vitro* ингибирующей активностью, которая следует фармакокинетическому профилю II типа с неполной нейтрализацией активности целевого фактора свертывания под действием аутоантитела, обычно приводя в результате к остаточным уровням фактора VIII в интервале от 2 до 18% в плазме пациента.

Пептид или композицию по настоящему изобретению можно вводить пациенту с приобретенной гемофилией, или пациенту, у которого предполагают риск развития приобретенной гемофилии, например, в связи с:

- i) предстоящим лечением, например, пенициллином или сульфонамидом,
- ii) прогрессированием опухоли или другого злокачественного заболевания,
- iii) предстоящей беременностью или беременностью на раннем сроке.

Настоящее изобретение далее будет описано посредством примеров, которые предназначены для того, чтобы помочь специалисту в данной области осуществить настоящее изобретение и не предназначены для ограничения объема изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Выбор HLA-DR2 пептидов фактора VIII

Серии 15-мерных пептидов FDVIII сравнивали, используя три алгоритма связывания HLA-DR:

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

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

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

Выбирали пептиды, которые предположительно были HLA-DR2-связывающими, с помощью более чем одной из программ, и для предполагаемых срединных остатков создавали фланкирующие последовательности (табл. 1).

Таблица 1

№ пептида	первая аминокислота FVIII	Последовательность в однобуквенном аминокислотном коде	Также названо здесь как
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIIARYIRLHPHNY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYYSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFLEPNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

Пример 2. Исследование ответа на пептиды HLA-DR2 рестриктированных клеток от мышей, иммунизированных фактором VIII

HLA-DR2 трансгенных мышей иммунизировали фактором VIII человека в адьюванте. Клетки дренирующих лимфатических узлов собирали и повторно стимулировали *in vitro* различными концентрациями 12 пептидов из табл. 1. Результаты представлены на фиг. 1.

HLA-DR2 рестриктированные клетки от мышей, иммунизированных фактором VIII, отчетливо реагировали строго на пептид DNIMV (1-я аминокислота 1788). Также существуют реакции на пептиды PRCLT (545) и PPIIA (2161).

Пример 3. Исследование ответа Т-клеток от мышей HLA-DR2 на пептиды

HLA-DR2 мышей сначала иммунизировали фактором VIII в адьюванте. Клетки селезенки от иммунизированных мышей повторно стимулировали *in vitro* фактором VIII, и полученные в результате лимфобласты сливали с тимомой BW5147, используя полиэтиленгликоль.

Т-клеточные гибридомы выбирали в среде НАТ, и гибридомы клонировали и тестировали на их реакцию на фактор VIII. Затем гибридомы подвергали скринингу на их реакцию на 12 предполагаемых пептидов. Из 27 гибридом, подвергнутых скринингу, 11 реагировали на DNIMV, 3 на PRCLT и 3 на PPIIA, хотя реакция на PPIIA была более слабой и менее специфичной. Реакция двух гибридом, специфичная в отношении DNIMV и PRCLT, представлена на фиг. 2.

Пример 4. Исследование ответа клеток лимфатических узлов от мышей FVIII-DR2+ на пептиды

HLA-DR2 трансгенных мышей скрещивали с мышами с недостаточностью фактора VIII, для создания модели гемофилии с экспрессией молекулы МНС II класса HLA человека.

Этих FVIII-DR2+ животных иммунизировали фактором VIII в адьюванте. Дренирующие лимфатические узлы выделяли и тестировали на их реакцию на панель пептидов. Как показано на фиг. 3, эти клетки хорошо реагировали на PRCLT и DNIMV. Была слабая реакция на GTLMV и значительная реакция на RYLRI.

Пример 5. Исследование реакции Т-клеток от мышей HLA-DR2 на пептиды

Мышей с недостаточностью фактора VIII, экспрессирующих HLA-DR2, иммунизировали фактором VIII в адьюванте. Клетки селезенки от иммунизированных мышей повторно стимулировали *in vitro* фак-

тором VIII, и полученные в результате лимфобласты сливали с BW5147, как описано выше. Т-клеточные гибридомы подвергали скринингу на их реакцию на 12 предполагаемых пептидов. В очередной раз большинство гибридом реагировало на пептиды DNIMV и PRCLT. Из 19 гибридом, специфичных в отношении фактора VIII, 10 реагировали на DNIMV, 6 на PRCLT, 1 на PPIIA, 1 на SLYIS и 1 на DTLLI. Примеры ответов этих гибридом представлены на фиг. 4.

Исходя из этих экспериментов, очевидно, что два пептида DNIMV (номер первой аминокислоты 1788) и PRCLT (первая аминокислота 545) составляют иммунодоминирующие Т-клеточные эпитопы в HLA-DR2 специфичной Т-клеточной реакции на фактор VIII человека.

Пример 6. DNIMV и PRCLT действуют как апитопы

Для того, чтобы представлять собой апитоп, пептид должен обладать способностью связываться с молекулой МНС I или II класса без дополнительного процессирования антигена (т.е. тримминга) и должен быть презентируван Т-клетке. В настоящем случае была исследована способность пептидов к презентации фиксированными APC.

Клетки Mgaг были либо свежими, либо фиксированными 1% параформальдегидом. Клоны тестировали на антигенную специфичность путем культивирования 100 мкл клеток гибридомы с 5×10^4 клеток Mgaг в присутствии или отсутствии 20 мкг/мл rhFVIII или пептидных эпитопов в течение ночи. Затем собирали супернатанты и анализировали на продукцию IL-2 с помощью ELISA. Тот факт, что rhFVIII должен быть презентируван живыми клетками Mgaг, демонстрирует то, что для презентации интактного белка требуется процессирование антигена. Пептиды DNIMV и PRCLT с одной стороны презентируются как живыми, так и фиксированными клетками Mgaг, указывая на то, что эти пептиды функционируют как апитопы (фиг. 5).

Пример 7. Определение диапазона пептидных эпитопов, способных функционировать как апитопы

Диапазон пептидных эпитопов, способных функционировать как апитопы в последовательностях, окружающих DNIMV, PRCLT и другие пептиды, был установлен путем получения панелей перекрывающихся пептидов (показано на стр. 36-37) и скрининга их, с использованием Т-клеточных гибридом, с помощью того же способа, как в примере 5 (фиг. 7).

Пример 8. DNIMV и PRCLT индуцируют толерантность к целому белку фактора VIII

HLA-DR2 трансгенным мышам вводили либо два растворимых пептида, либо PBS в качестве контроля, до иммунизации фактором VIII в адьюванте. Дренирующие лимфатические узлы выделяли, и клетки повторно стимулировали *in vitro* белком фактора VIII для оценки иммунного статуса мышей. Как показано на фиг. 6, введение мышам либо DNIMV, либо PRCLT приводило к значительной супрессии иммунного ответа на фактор VIII.

Пример 9. Исследование способности DNIMV и PRCLT индуцировать толерантность у мышей с нуль-мутацией гена фактора VIII

Из примера 8 известно, что эти два пептида обладают способностью предотвращать иммунную реакцию на фактор VIII у мышей, экспрессирующих эндогенный фактор VIII. Этот эксперимент повторили с животными FVIII-DR2+ для того, чтобы определить, предотвращают ли эти пептиды также иммунную реакцию на фактор VIII у мышей с недостаточностью фактора VIII.

Пример 10. Исследование способности DNIMV и PRCLT в сочетании индуцировать толерантность у мышей с нуль-мутацией гена фактора VIII

Были объединены два пептида, которые, как было показано в примере 9, по отдельности снижают иммунный ответ на фактор VIII у мышей с дефицитом фактора VIII. Как показано на фиг. 8, введение мышам и DNIMV, и PRCLT приводило к значительной супрессии иммунного ответа на фактор VIII, показанного снижением продукции IFN-гамма. IFN-гамма представляет собой основной класс лимфокина-переключателя, необходимого для нейтрализующих антител у мышей. Демонстрируемый эффект был выше, чем эффект, наблюдаемый с использованием любого из пептидов в отдельности.

Способы

(i) Вторичные иммунные реакции у DR2+ мышей, подвергнутых первичному воздействию rhFVIII

Мышей HLA-DR2+, нулевых по МНС класса II, иммунизировали 40 мкг rhFVIII, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда, дополненного 400 мкг инактивированных нагреванием *M.tuberculosis* H37Ra, подкожно в основание хвоста. 10 дней спустя мышей скарифицировали и удаляли дренирующие лимфатические узлы. Получали суспензии единичных клеток, и лимфоциты инкубировали при концентрации $4-5 \times 10^5$ клеток на лунку в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 72 ч с указанными концентрациями пептида или контрольных антигенов до импульсного воздействия 0,5 мКю/лунку меченым тритием тимидином в течение дополнительных 16 ч. Затем планшеты замораживали перед сбором клеток на слоях стеклянного фильтра, и включение радиоактивности измеряли, используя жидкостной сцинтилляционный β-счетчик.

(ii) Специфичность Т-клеточных гибридом в отношении FVIII пептида, полученных от мышей DR2+

Мышей HLA-DR2+, нулевых по МНС класса II, иммунизировали, как указано выше. На 10 день дренирующие лимфатические узлы удаляли и лимфоциты культивировали при $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, 1

мл/лунку в 24 луночных планшетах в присутствии 20 мкг/мл rhFVIII в течение 3 дней. После этой стимуляции лимфоциты извлекали, промывали и сливали с TCR $\alpha\beta^+$ сливающимися клетками BW в соотношении 4 клетки BW на 1 лимфоцит, используя полиэтиленгликоль, как описано у Nelson et al. (1980) PNAS 77(5):2866. Слитые клетки осторожно промывали, а затем высевали в плоскodonные 96-луночные планшеты в течение 2 дней перед добавлением среды HAT для отбора Т-клеточных гибридом. Клетки подвергали мониторингу во время роста и приблизительно через 10 дней после проведения слияния отдельные клоны были отобраны и перенесены в 24-луночные планшеты в среду HAT. Клоны подращивали в среде HAT в течение по меньшей мере 2 недель до переноса в среду HT, а затем в полную среду. Клоны тестировали на антигенную специфичность путем культивирования 100 мкл гибридных клеток с 5×10^4 клеток Mga в присутствии или отсутствии 20 мкг/мл rhFVIII в течение ночи. Затем супернатанты собирали и оценивали продукцию IL-2 с помощью ELISA, с клонами, продуцирующими IL-2 в ответ на rhFVIII, считающимися позитивными в отношении FVIII-специфичности. Для исследования репертуара предполагаемых FVIII пептидов, FVIII-специфичные клоны снова тестировали на продукцию IL-2, с последующим инкубированием в течение ночи с 20 мкг/мл каждого из 12 пептидов.

(iii) Вторичные иммунные реакции у мышей FVIII $^{-/-}$, подвергнутых первичному воздействию rhFVIII

Тот же способ проводили, как в пункте (i), за исключением того, что мыши были с недостаточностью FVIII, HLA-DR2 $^{+}$ и мышей, нулевых по MHC класса II.

(iv) Специфичность в отношении пептида FVIII Т-клеточных гибридом, полученных от мышей FVIII $^{-/-}$

Тот же способ проводили, как и в случае (ii), за исключением того, что мыши были с дефицитом FVIII и HLA-DR2 $^{+}$.

(v) Индукция толерантности FVIII-специфичных реакций у мышей DR2 $^{+}$ путем предварительного введения иммунодоминантных пептидов FVIII

Мышам HLA-DR2 $^{+}$, нулевым по MHC класса II, вводили 3 раза 100 мкг DNIMV, PRCLT или РРПА, растворенных в PBS, или эквивалентное количество только PBS. Пептиды вводили внутрибрюшинно, с перерывом 3-4 дня между каждой дозой. После последнего введения мышей подвергали первичному воздействию rhFVIII, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда, как в пункте (i). 10 дней спустя дренирующие лимфатические узлы извлекали, и лимфоциты впоследствии культивировали *in vitro* с rhFVIII, или с каждым из пептидов, вызывающим толерантность, а также контрольными антигенами, в течение 72 ч перед добавлением меченого тритием тимидина, как в пункте (i).

(vi) Индукция толерантности FVIII-специфичных реакций у мышей DR2 $^{+}$ путем предварительной обработки сочетанием иммунодоминантных пептидов FVIII

Мышам HLA-DR2 $^{+}$, нулевым по MHC класса II, 3 раза вводили DNIMV, PRCLT или сочетание DNIMV и PRCLT, растворенных в PBS, или эквивалентный объем только PBS. Пептиды вводили внутрибрюшинно, на протяжении 8 дней. После последнего введения мышей подвергали первичному воздействию rhFVIII, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда, как в пункте (i). 10 дней спустя дренирующие лимфатические узлы извлекали, и лимфоциты впоследствии повторно стимулировали *in vitro* с использованием rhFVIII. Супернатанты затем собирали и измеряли IFN-гамма.

Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в качестве ссылки. Различные модификации и варианты описанных способов и систем по изобретению будут очевидны специалистам в данной области без отклонения от объема и сущности изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано применительно к особым предпочтительным вариантам осуществления, должно быть понятно, что настоящее изобретение, как заявлено, не должно быть ненадлежащим образом ограничено до таких особых вариантов осуществления. В действительности, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в клеточных исследованиях с использованием проточной цитометрии или в родственных областях, предназначены для включения в объем следующей формулы изобретения.

SEQ ID No.1

1 mqieltciff lclrfcfa tryyigave lswdymqsdI gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvykktif veftdhifni akprppwmgl lgpitqaevy dtvvitknm ashpvsihav
 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddqvfpq gshlyvwqvi kengpmasdp lcltysytsh
 181 vdlvkdinsg ligalivre gslakektqt lkhfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
 241 aasarawpkm htvngyvnrslpgllgchrk svywhvigm tpevhstfl eghtflvmh
 301 rqaaleispi tftaqtlim dlqqlifch lsshqhdgme ayvkvdscpe epqlmkkne
 361 eaedydddt dsemdivrfd ddnpsstfql rsvakkhpk wvhyiaaeae dwdyaplvia
 421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkrvrmay tdtftkrea lqhesgilp llygevgdtl
 481 lllfkqasr pyniypghit dvrlpysml pkgvkhikdf plpgeifky kwtvtvedgp
 541 tkdprcltr yysafvnmmer dlasglip licykesvdq rgnqlmsdkr nvilfsvde
 601 nrswyiteni qrlpnpagv qledpefqaas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
 661 igaqtdflsv flsagytflkh mvyedtitf pfsgetvfms menpgwilg chnsdfmrq
 721 mtaillkvssc dktgdyyed syedisaytl sknnaleprs fsqnsrhpst rqqkfnatti
 781 pendiektdp wfahrtpmpk knvsssdll mlrqspiph glslsdqea kyelfsddps
 841 pgaldsnnsi semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrine klgttaatel kklfkvsst
 901 snnlstips dnlaagtdnt slgppsmvp hydsqldtll fgkksplte sgglslsee
 961 nndskilesq lmsqesswg knvssesqr lfkgrahgp allkdnaif kvslslktn
 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn llesdtefkk vtpilhdml mdknatairl
 1081 nhmsnktts knmemvqqkk egplppdaqn pdmsfkmif lpesarwiqr thgknsnsg
 1141 qgpepkqlvs lqpeksvegq nlfeknkvv vqkgeftkdv glkamvfps mlftnldn
 1201 lhennthnqe kklqeielekk etliqenvvi pqihvtgtk nfmknflts trqnvegsyd
 1261 gayapvlqdf rslnstdnrt kkhthafskk geenlegig nqtqiveky actrispnt
 1321 sqqrvtqrs kraikqfrp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst flqidyneke
 1381 kgaitqpsls dcltrahsp qanrspipia kvssfpsir iytrvifqd nshlpaasy
 1441 rkcdsgvqes shfiqgakkn nlsalitle mtgdqrevgs lqtsatnsvt ykkventvlp
 1501 kpdipktsqk velipkvhiy qkdlftets ngspghidlv egslqgteg aikwneanrp
 1561 gkvplrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeawk sqekspekta flkkdtlsil
 1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqr tericsqnp vlkrhqreit rttqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkkrthya avertwdygm sssphvlmr
 1741 aqsgsvpqfk kvvfqefidg stqplyrge lnehlgilp yiraavedni mvtfrnqasr
 1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpe tkyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhesgl igpllvchtn tnpahgrqv tvqefalft lfdetkswyf tenmernra
 1921 pcniqmedpt fkenyrthai ngymdtlpg lvmaqdqrir wylismgsne nlshihfsg
 1981 vlvrkkeey kmalynlypg vftvmlps kagiwrvec lgehlhagms flflvysnkc
 2041 qtlpgmasgh irdqitasg qyqgwapkla rhyysgna wstkepfswi kvdlapmli
 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf imysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssghkhnfn
 2161 ppliaryiri hpthysirst lrmewmgcdl ncsmpigme skaisdaqit assyftnmfa
 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktnkvt gvtqgvksl ltsmyvkefi
 2281 lsssqdghqw tiffqngkvk vfqngqdsft pvnslppl lrylrhpq swvhqialrm
 2341 evlgceaqdl y

Панели перекрывающихся пептидов, полученные в примере 7
 Перекрывающийся набор для DTLLIFKNQASRPY

1.	473-488	YGEVGD DTLLIFKNQ
2.	474-489	GEVGD DTLLIFKNQA
3.	475-490	EVGDT LLIFKNQAS
4.	476-491	VGD DTLLIFKNQASR
5.	477-492	GD DTLLIFKNQASRP
6.	478-493	DT LLIFKNQASRPY
7.	479-494	TL LIFKNQASRPYN
8.	480-495	LL IFKNQASRPYNI
9.	481-496	L IFKNQASRPYNTY
10.	482-497	I IFKNQASRPYNTYP
11.	483-498	IF KNQASRPYNTYPH

Перекрывающийся набор для PRCLTRYSSSFVNME

1.	540-554	PTKSD PRCLTRYSS
2.	541-555	TKSD PRCLTRYSSF
3.	542-556	KSD PRCLTRYSSFV
4.	543-557	SD PRCLTRYSSFVN
5.	544-558	D PRCLTRYSSFVNM
6.	545-559	PR CLTRYSSFVNME
7.	546-560	R CLTRYSSFVNMER
8.	547-561	CL TRYSSFVNMERD
9.	548-562	L TRYSSFVNMERDL
10.	549-563	TR YYSSFVNMERDLA
11.	550-564	RY YSSFVNMERDLAS

Перекрывающийся набор для DNIMVTFRNQASRPY

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

Перекрывающийся набор для SLYISQFIIMYSLDG

1.	2109-2123	RQKFSS LYISQFIIM
2.	2110-2124	QKFSS LYISQFIIMY

3. 2111-2125	KFSSLYISQFIIMYS
4. 2112-2126	FSSLYISQFIIMYSL
5. 2113-2127	SSLYISQFIIMYSLD
6. 2114-2128	SLYISQFIIMYSLDG
7. 2115-2129	LYISQFIIMYSLDGK
8. 2116-2130	YISQFIIMYSLDGKK
9. 2117-2131	ISQFIIMYSLDGKKW
10. 2118-2132	SQFIIMYSLDGKKWQ
11. 2119-2133	QFIIMYSLDGKKWQT

Перекрывающийся набор для PPIARYIRLHPTHY

1. 2156-2170	HNIFNPPPIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPPIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPPIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIARYIRLHPT
5. 2160-2174	NPPPIARYIRLHPH
6. 2161-2175	PPIARYIRLHPH
7. 2162-2176	PIARYIRLHPHYS
8. 2163-2177	IARYIRLHPHYSI
9. 2164-2178	IARYIRLHPHYSIR
10. 2165-2179	ARYIRLHPHYSIRS
11. 2166-2180	RYIRLHPHYSIRST

Перекрывающийся набор для RYLRIHPQSWVHQIA

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, состоящий из одной из следующих последовательностей:

PRCLTRYYYSSFVNME
VEDNIMVTFRNQASR
DNIMVTFRNQASRPY
IMVTFRNQASRPYSF
MVTFRNQASRPYSFY
VTFRNQASRPYSFYS
TKSDPRCLTRYYYSSF
KSDPRCLTRYYYSSFV
SDPRCLTRYYYSSFVN
DPRCLTRYYYSSFVNM
RCLTRYYYSSFVNMER
CLTRYYYSSFVNMERD
PPIARYIRLHPH
PIARYIRLHPHYS
ARYIRLHPHYSIRS
GDTLLIIFKNQASRP
DTLLIIFKNQASRPY
TLLIIFKNQASRPYN
RQKFSSLYISQFIIM
QKFSSLYISQFIIMY
PPLLTRYLRIHPQSW
PLLTRYLRIHPQSWV
RYLRIHPQSWVHQIA
YLRIHPQSWVHQIAL
LRIHPQSWVHQIALR

способный предотвратить образование антител в отношении фактора VIII in vivo.

2. Композиция, содержащая два или более пептида по п.1.

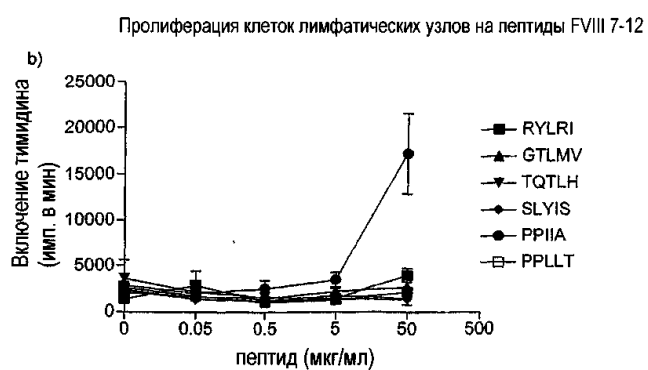
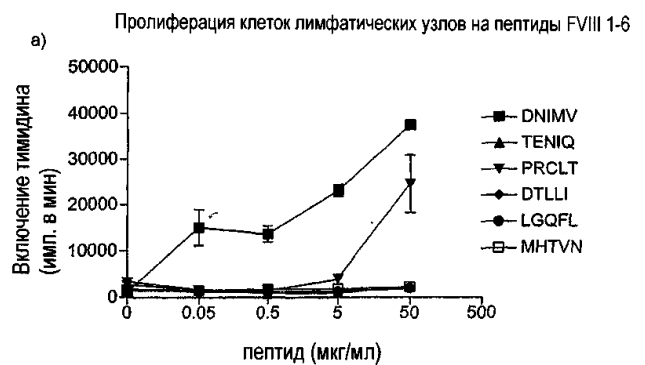
3. Пептид по п.1 или композиция по п.2 в лечении гемофилии у индивидуума.

4. Применение по п.3, где индивидуум страдает гемофилией А и получает или планирует получать заместительную терапию фактором VIII.

5. Применение по п.3, где индивидуум страдает приобретенной гемофилией или имеет риск разви-

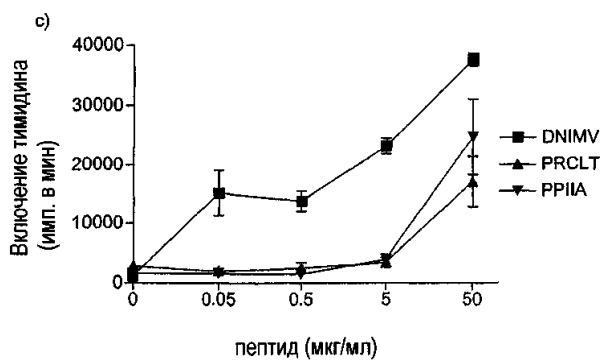
тия этого заболевания.

6. Применение по п.3, где индивидуум является HLA-DR2.

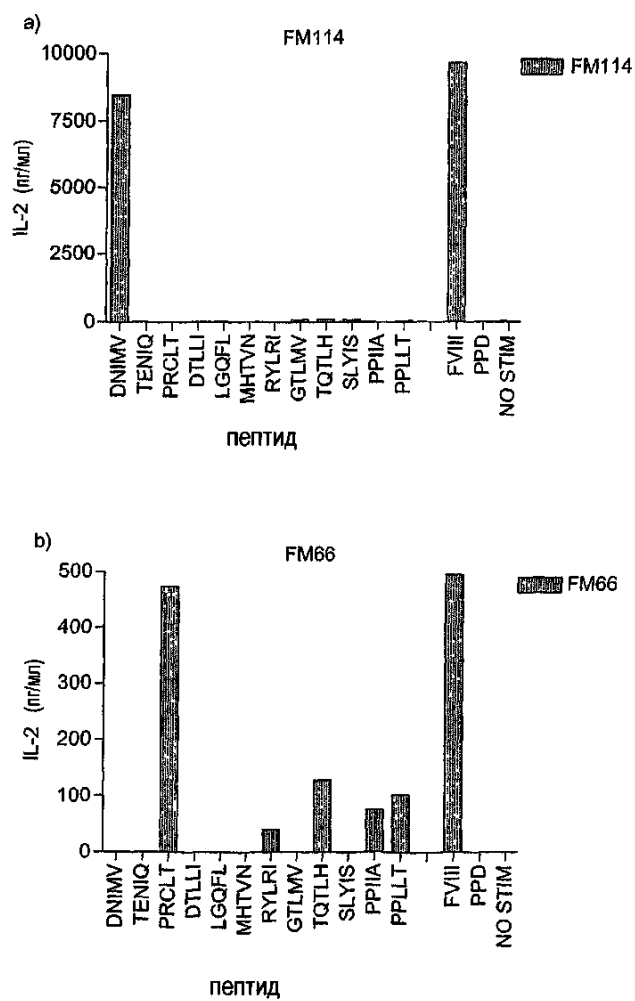


Фиг. 1

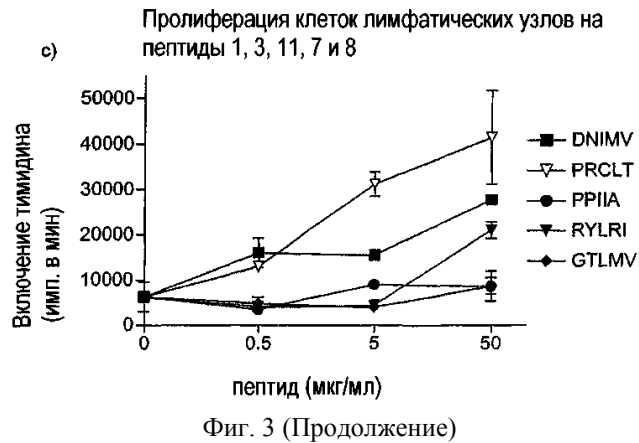
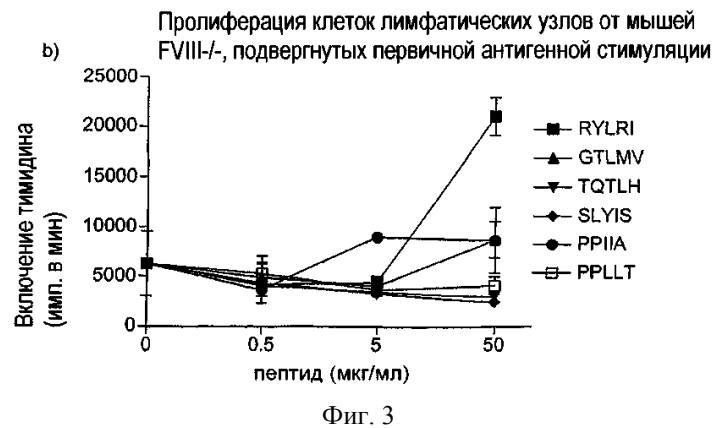
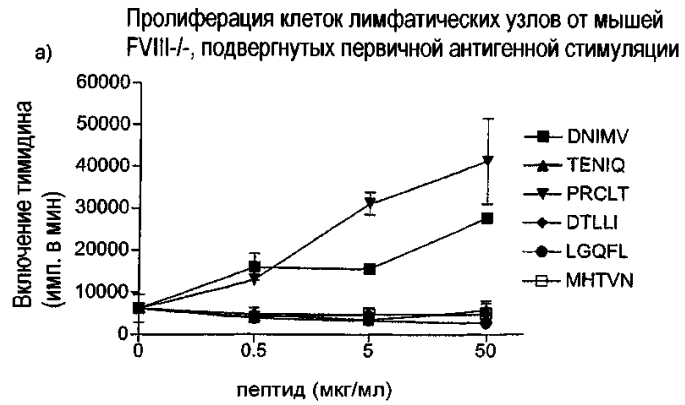
Проплиферация клеток лимфатических узлов на пептиды FVIII 1, 3 и 11

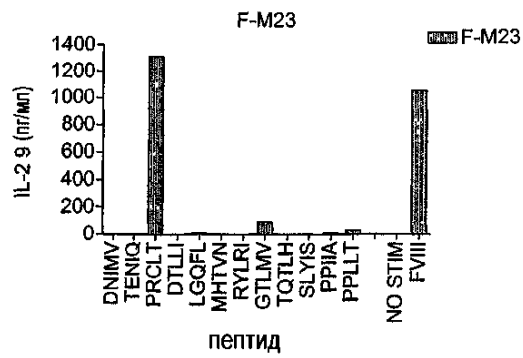
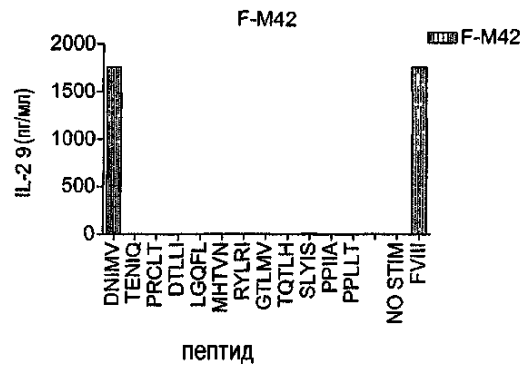


Фиг. 1 (Продолжение)

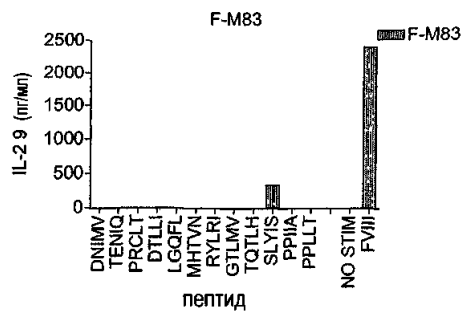
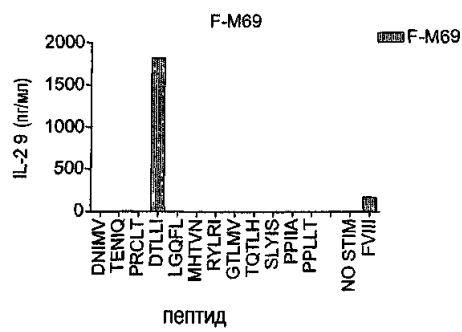


Фиг. 2



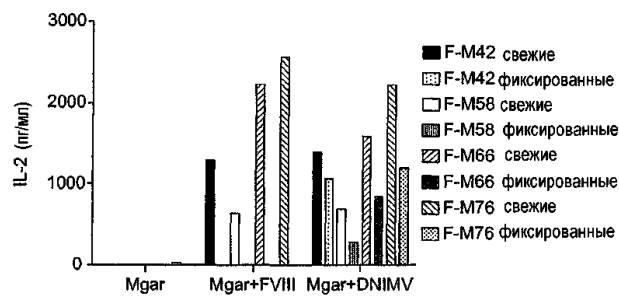


Фиг. 4

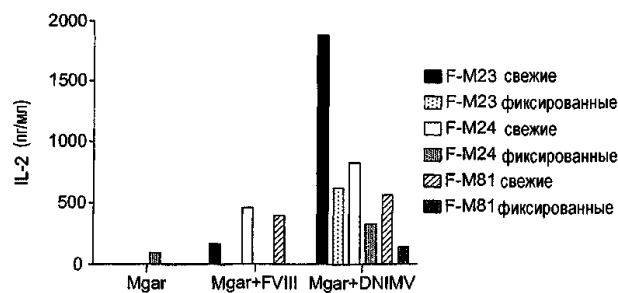


Фиг. 4 (Продолжение)

FVIII-/- клоны, специфичные в отношении DNIMV

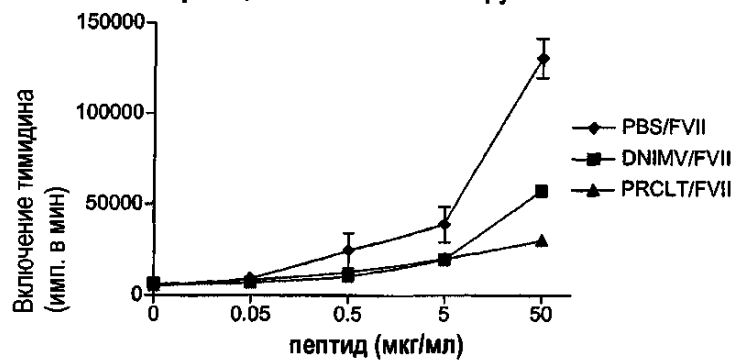


FVIII-/- клоны, специфичные в отношении PRCLT



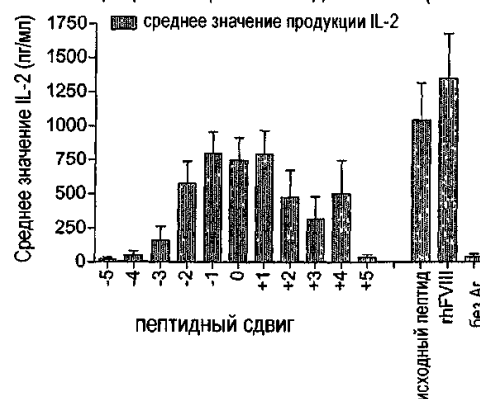
Фиг. 5

реакции на FVIII во всех группах

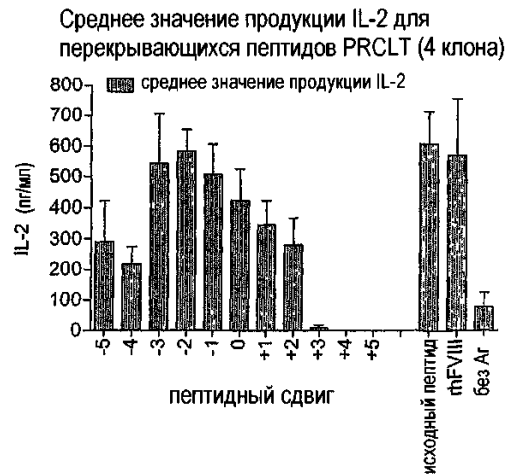


Фиг. 6

Среднее значение продукции IL-2 для перекрывающихся пептидов DNIMV (8 клонов)

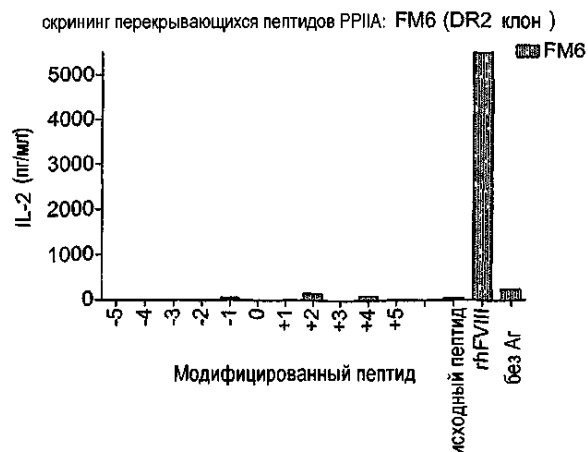
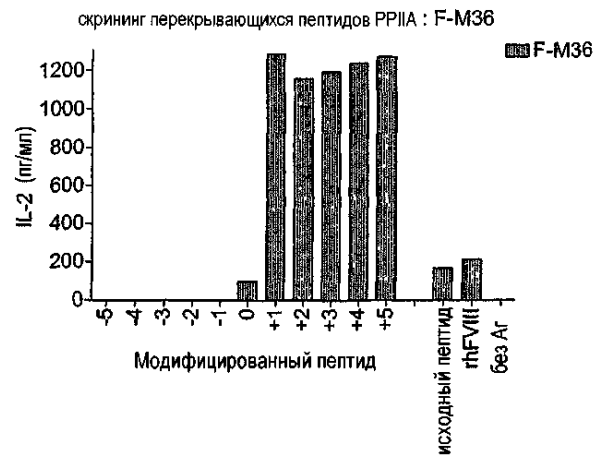


Фиг. 7a

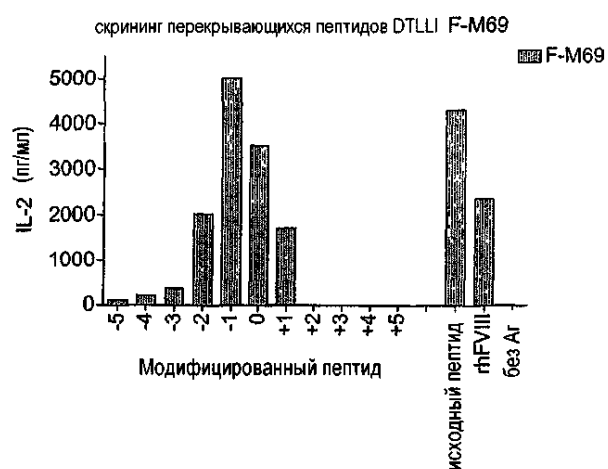
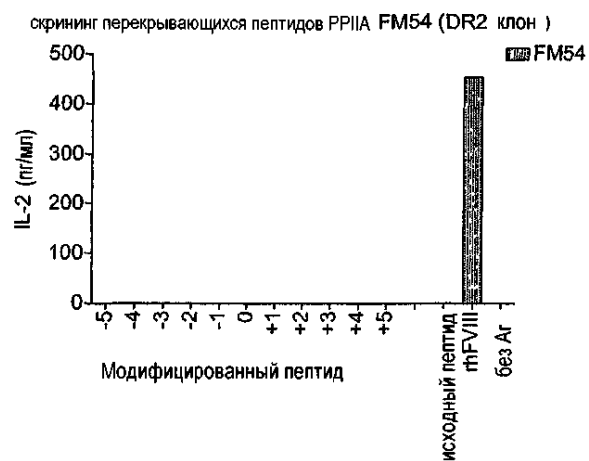


Фиг. 7b

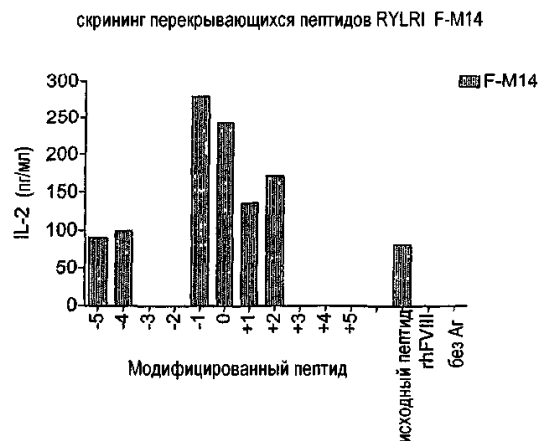
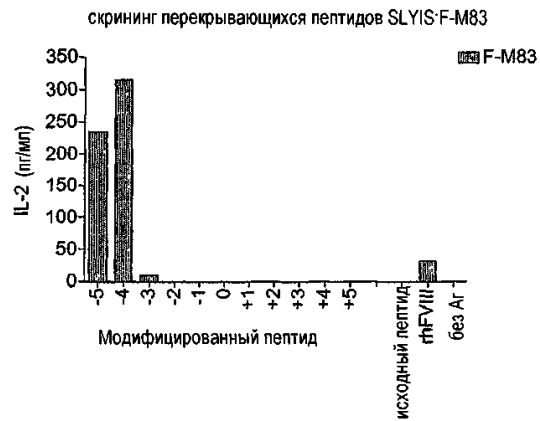
Среднее значение продукции IL-2 для перекрывающихся пептидов
PPIIA, DTLLI, SLYIS и RYLRI



Фиг. 7C

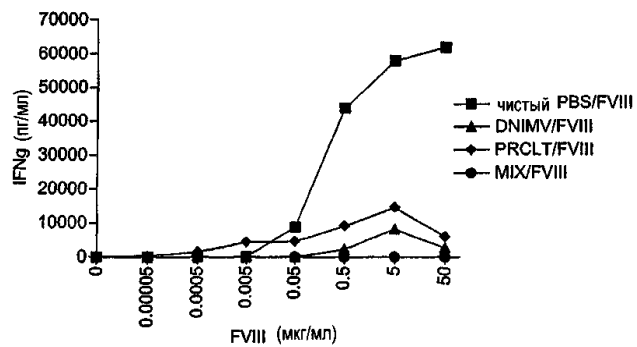


Фиг. 7С (Продолжение)



Фиг. 7С (Продолжение)

продукция IFN-гамма клетками лимфатического узла в ответ на FVIII



Фиг. 8

Список последовательностей

<110> Apitope Technology (Bristol) Limited

<120> ПЕПТИДЫ FVIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИНДУКЦИИ
ТОЛЕРАНТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ

<130> P031150EA

<140> PCT/GB2008/003996

<141> 2008-12-03

<150> GB 0723712.6

<151> 2007-12-04

<160> 96

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

019370

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765
 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860
 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880
 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895
 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925

019370

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu
1040 1045 1050

Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg
1055 1060 1065

Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met
1070 1075 1080

Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln
1085 1090 1095

Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met
1100 1105 1110

Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile
1115 1120 1125

Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro
1130 1135 1140

Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu
1145 1150 1155

Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys
1160 1165 1170

Gly Glu	Phe Thr Lys Asp Val	Gly Leu Lys Glu Met	Val Phe Pro
1175	1180	1185	
Ser Ser	Arg Asn Leu Phe Leu	Thr Asn Leu Asp Asn	Leu His Glu
1190	1195	1200	
Asn Asn	Thr His Asn Gln Glu	Lys Lys Ile Gln Glu	Glu Ile Glu
1205	1210	1215	
Lys Lys	Glu Thr Leu Ile Gln	Glu Asn Val Val Leu	Pro Gln Ile
1220	1225	1230	
His Thr	Val Thr Gly Thr Lys	Asn Phe Met Lys Asn	Leu Phe Leu
1235	1240	1245	
Leu Ser	Thr Arg Gln Asn Val	Glu Gly Ser Tyr Asp	Gly Ala Tyr
1250	1255	1260	
Ala Pro	Val Leu Gln Asp Phe	Arg Ser Leu Asn Asp	Ser Thr Asn
1265	1270	1275	
Arg Thr	Lys Lys His Thr Ala	His Phe Ser Lys Lys	Gly Glu Glu
1280	1285	1290	
Glu Asn	Leu Glu Gly Leu Gly	Asn Gln Thr Lys Gln	Ile Val Glu
1295	1300	1305	
Lys Tyr	Ala Cys Thr Thr Arg	Ile Ser Pro Asn Thr	Ser Gln Gln
1310	1315	1320	
Asn Phe	Val Thr Gln Arg Ser	Lys Arg Ala Leu Lys	Gln Phe Arg
1325	1330	1335	
Leu Pro	Leu Glu Glu Thr Glu	Leu Glu Lys Arg Ile	Ile Val Asp
1340	1345	1350	
Asp Thr	Ser Thr Gln Trp Ser	Lys Asn Met Lys His	Leu Thr Pro
1355	1360	1365	
Ser Thr	Leu Thr Gln Ile Asp	Tyr Asn Glu Lys Glu	Lys Gly Ala
1370	1375	1380	
Ile Thr	Gln Ser Pro Leu Ser	Asp Cys Leu Thr Arg	Ser His Ser
1385	1390	1395	
Ile Pro	Cln Ala Asn Arg Ser	Pro Leu Pro Ile Ala	Lys Val Ser
1400	1405	1410	

Ser Phe	Pro Ser Ile Arg	Pro	Ile Tyr Leu Thr	Arg	Val Leu Phe
1415		1420		1425	
Gln Asp	Asn Ser Ser His	Leu	Pro Ala Ala Ser	Tyr	Arg Lys Lys
1430		1435		1440	
Asp Ser	Gly Val Gln Glu	Ser	Ser His Phe Leu	Gln	Gly Ala Lys
1445		1450		1455	
Lys Asn	Asn Leu Ser Leu	Ala	Ile Leu Thr Leu	Glu	Met Thr Gly
1460		1465		1470	
Asp Gln	Arg Glu Val Gly	Ser	Leu Gly Thr Ser	Ala	Thr Asn Ser
1475		1480		1485	
Val Thr	Tyr Lys Lys Val	Glu	Asn Thr Val Leu	Pro	Lys Pro Asp
1490		1495		1500	
Leu Pro	Lys Thr Ser Gly	Lys	Val Glu Leu Leu	Pro	Lys Val His
1505		1510		1515	
Ile Tyr	Gln Lys Asp Leu	Phe	Pro Thr Glu Thr	Ser	Asn Gly Ser
1520		1525		1530	
Pro Gly	His Leu Asp Leu	Val	Glu Gly Ser Leu	Leu	Gln Gly Thr
1535		1540		1545	
Glu Gly	Ala Ile Lys Trp	Asn	Glu Ala Asn Arg	Pro	Gly Lys Val
1550		1555		1560	
Pro Phe	Leu Arg Val Ala	Thr	Glu Ser Ser Ala	Lys	Thr Pro Ser
1565		1570		1575	
Lys Leu	Leu Asp Pro Leu	Ala	Trp Asp Asn His	Tyr	Gly Thr Gln
1580		1585		1590	
Ile Pro	Lys Glu Glu Trp	Lys	Ser Gln Glu Lys	Ser	Pro Glu Lys
1595		1600		1605	
Thr Ala	Phe Lys Lys Lys	Asp	Thr Ile Leu Ser	Leu	Asn Ala Cys
1610		1615		1620	
Glu Ser	Asn His Ala Ile	Ala	Ala Ile Asn Glu	Gly	Gln Asn Lys
1625		1630		1635	
Pro Glu	Ile Glu Val Thr	Trp	Ala Lys Gln Gly	Arg	Thr Glu Arg
1640		1645		1650	

019370

Leu Cys	Ser Gln Asn Pro Pro	Val Leu Lys Arg His	Gln Arg Glu
1655	1660	1665	
Ile Thr	Arg Thr Thr Leu Gln	Ser Asp Gln Glu Glu	Ile Asp Tyr
1670	1675	1680	
Asp Asp	Thr Ile Ser Val Glu	Met Lys Lys Glu Asp	Phe Asp Ile
1685	1690	1695	
Tyr Asp	Glu Asp Glu Asn Gln	Ser Pro Arg Ser Phe	Gln Lys Lys
1700	1705	1710	
Thr Arg	His Tyr Phe Ile Ala	Ala Val Glu Arg Leu	Trp Asp Tyr
1715	1720	1725	
Gly Met	Ser Ser Ser Pro His	Val Leu Arg Asn Arg	Ala Gln Ser
1730	1735	1740	
Gly Ser	Val Pro Gln Phe Lys	Lys Val Val Phe Gln	Glu Phe Thr
1745	1750	1755	
Asp Gly	Ser Phe Thr Gln Pro	Leu Tyr Arg Gly Glu	Leu Asn Glu
1760	1765	1770	
His Leu	Gly Leu Leu Gly Pro	Tyr Ile Arg Ala Glu	Val Glu Asp
1775	1780	1785	
Asn Ile	Met Val Thr Phe Arg	Asn Gln Ala Ser Arg	Pro Tyr Ser
1790	1795	1800	
Phe Tyr	Ser Ser Leu Ile Ser	Tyr Glu Glu Asp Gln	Arg Gln Gly
1805	1810	1815	
Ala Glu	Pro Arg Lys Asn Phe	Val Lys Pro Asn Glu	Thr Lys Thr
1820	1825	1830	
Tyr Phe	Trp Lys Val Gln His	His Met Ala Pro Thr	Lys Asp Glu
1835	1840	1845	
Phe Asp	Cys Lys Ala Trp Ala	Tyr Phe Ser Asp Val	Asp Leu Glu
1850	1855	1860	
Lys Asp	Val His Ser Gly Leu	Ile Gly Pro Leu Leu	Val Cys His
1865	1870	1875	
Thr Asn	Thr Leu Asn Pro Ala	His Gly Arg Gln Val	Thr Val Gln
1880	1885	1890	

Glu Phe	Ala Leu Phe Phe Thr	Ile Phe Asp Glu Thr	Lys Ser Trp
1895	1900	1905	
Tyr Phe	Thr Glu Asn Met Glu	Arg Asn Cys Arg Ala	Pro Cys Asn
1910	1915	1920	
Ile Gln	Met Glu Asp Pro Thr	Phe Lys Glu Asn Tyr	Arg Phe His
1925	1930	1935	
Ala Ile	Asn Gly Tyr Ile Met	Asp Thr Leu Pro Gly	Leu Val Met
1940	1945	1950	
Ala Gln	Asp Gln Arg Ile Arg	Trp Tyr Leu Leu Ser	Met Gly Ser
1955	1960	1965	
Asn Glu	Asn Ile His Ser Ile	His Phe Ser Gly His	Val Phe Thr
1970	1975	1980	
Val Arg	Lys Lys Glu Glu Tyr	Lys Met Ala Leu Tyr	Asn Leu Tyr
1985	1990	1995	
Pro Gly	Val Phe Glu Thr Val	Glu Met Leu Pro Ser	Lys Ala Gly
2000	2005	2010	
Ile Trp	Arg Val Glu Cys Leu	Ile Gly Glu His Leu	His Ala Gly
2015	2020	2025	
Met Ser	Thr Leu Phe Leu Val	Tyr Ser Asn Lys Cys	Gln Thr Pro
2030	2035	2040	
Leu Gly	Met Ala Ser Gly His	Ile Arg Asp Phe Gln	Ile Thr Ala
2045	2050	2055	
Ser Gly	Gln Tyr Gly Gln Trp	Ala Pro Lys Leu Ala	Arg Leu His
2060	2065	2070	
Tyr Ser	Gly Ser Ile Asn Ala	Trp Ser Thr Lys Glu	Pro Phe Ser
2075	2080	2085	
Trp Ile	Lys Val Asp Leu Leu	Ala Pro Met Ile Ile	His Gly Ile
2090	2095	2100	
Lys Thr	Gln Gly Ala Arg Gln	Lys Phe Ser Ser Leu	Tyr Ile Ser
2105	2110	2115	
Gln Phe	Ile Ile Met Tyr Ser	Leu Asp Gly Lys Lys	Trp Gln Thr
2120	2125	2130	

019370

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>	2		
<211>	9		

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 2

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 3

Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 4

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 5

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 6

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 7

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 8

Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1 5

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 9

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

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 10

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

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 11

```

Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
1           5           10           15

```

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 12

```

Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
1           5           10           15

```

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 13

```

Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
1           5           10           15

```

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 15

```

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys
1           5           10           15

```


<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 16

Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met
1				5					10					15

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 17

Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr
1				5					10					15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 18

Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser
1				5					10					15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 19

Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu
1				5					10					15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 20

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 21

Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys
1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 22

Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 23

Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln
1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 24

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 25

Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 26

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 27

Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 28

Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 29

Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His
1			5					10					15	

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 30

Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 31

Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
1				5					10					15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 32

Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 33

Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile
1				5					10					15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 34
 Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn
 1 5 10 15

 <210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 35
 Gly Asp Thr Leu Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 1 5 10 15

 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 36
 Val Gly Asp Thr Leu Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
 1 5 10 15

 <210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 37
 Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15

 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 38

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

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 42

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

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 43
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu
 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 44
 Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 45
 Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 46
 Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 47
 Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 48

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

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 49

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

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 50

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

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 51

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

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 52

Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile
1				5					10					15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 53

Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln
1				5					10					15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 54

Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His
1				5					10					15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 55

Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val
1				5					10					15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 56

Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile
1				5				10						15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 57

Thr	Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp
1				5					10					15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 58

Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp
1				5					10					15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 59

Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 60

Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His
1				5					10					15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 61

Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln
1 5 10 15

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 62

Gly Thr Leu Met Val
1 5

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 63

Thr Gln Thr Leu His
1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 64

Ser Leu Tyr Ile Ser
1 5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 65

Pro Pro Ile Ile Ala
1 5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 66

Pro Pro Leu Leu Thr
 1 5

<210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 67

Met His Thr Val Asn
 1 5

<210> 68
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 68

Leu Gly Gln Phe Leu
 1 5

<210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 69

Asp Thr Leu Leu Ile
 1 5

<210> 70
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 70

Pro Arg Cys Leu Thr
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 71

Thr Glu Asn Ile Gln
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 72

Asp Asn Ile Met Val
1 5

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 73

Arg Tyr Leu Arg Ile
1 5

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 74

Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 75
 Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala
 1 5 10 15
 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 76
 Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 77
 Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 78
 Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид
 <400> 79
 Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 1 5 10 15

<210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 80

Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His
1				5					10				15	

<210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 81

Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser
1				5				10					15	

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 82

Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe
1				5				10					15	

<210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 83

Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala
1				5				10					15	

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 84

Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 85

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

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 86

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

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 87

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

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 88

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1 5 10 15

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 89

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 90

His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 91

Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His
 1 5 10 15

<210> 92
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 92

Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 93

Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr
 1 5 10 15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 94

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

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 95

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

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 96

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



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2