

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 019370

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.03.31

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

(21) Номер заявки
201070681

(22) Дата подачи заявки
2008.12.03

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

(31) 0723712.6

(56) WO-A-02060917
WO-A-03087161

(32) 2007.12.04

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

(33) GB

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

(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)

(57) Настоящее изобретение относится к пептиду, содержащему последовательность серединных
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 супрессии 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 рассовых 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 проокоагуляционную 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.

T-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) *Naemophilus 12 (supp 6)* 30-36). Эти пептиды затем презентируются на поверхности APC совместно с молекулами МНС II класса. Затем этот комплекс распознается T-клеточным рецептором CD4+ клеток, специфичным в отношении FVIII. В присутствии соответствующих костимулирующих сигналов это распознавание в конечном счете вызывает синтез антител B-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 (FEIBATM), 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).

Иммуносупрессирующая терапия иногда применяется у пациентов, которые не отвечают на ИИТ. Лечение включает введение иммуносупрессирующих 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 RituximabTM, гуманизированного моноклонального антитела к CD20 антигену В-клеток. Однако, инфузационные 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, устраниить аутоантитела для восстановления нормального свертывания.

Некоторые кровотечения, связанные с низким титром аутоантительных ингибиторов (<5 единиц Беттезда) 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 кортикоидов 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 РитуксимабомTM, 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 A, и продукции антител при приобретенной гемофилии, имеют недостатки. Следовательно, существует необходимость в улучшенных способах, направленных на проблему анти-FVIII антител при гемофилии A 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 суппресии иммунологической реакции на фактор VIII.

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

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

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

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

В 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: PRCLTRYYSSFVNME 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 суппресии, снижения или предотвращения образования ингибирующих антител к фактору VIII.

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

Настоящее изобретение также относится к способу суппресии, 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,
- в) 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-/- клон, 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 апипептидов, с использованием клонов Т-клеточной гибридомы FVTII-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 промышленной 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 серединных остатков представляют или содержат минимальный эпитоп для каждой области.

Эпитопы

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 апипопами (независимые от процессирования антигена эпипопы), 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 апипопы, 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 серединных остатков:

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV.

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

IARYIRLHP
LTRYYSSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV.

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

LTRYYSSFV
MVTFRNQAS.

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

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

Например, пептид может быть выбран из следующей группы:

SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSSFVNME
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA.

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

имеют такую же последовательность серединных остатков, но которые отличаются одним или несколькими flankирующими остатками.

Для того, чтобы это проверить, может быть получена панель перекрывающихся пептидов. Обычно кластер пептидов в панеле способен вызывать иммунную реакцию, поскольку они содержат минимальный эпиген. 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
LYISQFIIMMYSLDGK
RQKFSSLYISQFIIM
QKFSSLYISQFIIMY
KFSSLYISQFIIMYS
FSSLYISQFIIMYSL
SSLYISQFIIMYSLD
YISQFIIMYSLDGKK
ISQFIIMYSLDGKKW
SQFIIMYSLDGKKWQ
QFIIMYSLDGKKWQT
FIIMYSLDGKKWQTY
TARYIRLHPTHYSIR
IIARYIRLHPTHYSI
PIIARYIRLHPTHYS
PPIIARYIRLHPTHY
NPPIIARYIRLHPTH
FNPPIIARYIRLHPT
IFNPPIIARYIRLHP
LIIFKNQASRPYNIY
LLIIFKNQASRPYNI
TLLIIFKNQASRPYN
DTLLIIFKNQASRPY
GDTLLLIFKNQASRP
VGDTLLLIFKNQASR
EVGDTLLLIFKNQAS
KSDPRCLTRYYSSFV
SDPRCLTRYYSSFVN
DPRCLTRYYSSFVN
PRCLTRYYSSFVNME
RCLTRYYSSFVNMER
CLTRYYSSFVNMERD
LTRYYSSFVNMERDL

EVEDNIMVTFRNQAS
VEDNIMVTFRNQASR
EDNIMVTFRNQASRP
DNIMVTFRNQASRPY
NIMVTFRNQASRPYS
IMVTFRNQASRPYSF
MVTFRNQASRPYSFY
LRIHPQSWVHQIALR
YLRIHPQSWVHQIAL
RYLRIHPQSWVHQIA
TRYLRIHPQSWVHQI
LTRYLRIHPQSWVHQ
LLTRYLRIHPQSWVH
PLLTRYLRIHPQSWV

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:

- фиксированные APC (с антителами к CD28, или без них);
- липидные мембранны, содержащие молекулы МНС I или II класса (с антителами к CD28, или без них); и
- 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 презентированным 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 мембранны (которые могут представлять собой плоские мембранны или липосомы) могут быть получены с использованием искусственных липидов или могут представлять собой плазматические мембранны/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 ^{3}H тимицина 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 Ca^{2+} 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 пептидсвязывающим 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 используемые 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), пириилаланин, 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-аминогептаноевая 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 (ЕАЕ - модель рассеянного склероза (РС)) (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 увеоретинита (обзор представлен Anderton и Wraith (1998), как указано выше). Это также было продемонстрировано как средство лечения текущего заболевания при ЕАЕ (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" АРС, способной передавать Т-клеткам два сигнала. Первый сигнал (сигнал 1) передается комплексом МНС-пептид на клеточной поверхности АРС и принимается Т-клеткой через ТСР. Второй сигнал (сигнал 2) передается костимулирующими молекулами на поверхности АРС, 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 супрессировать 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 презентированы 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 АРС. 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 АРС. Однако иммунная система содержит гораздо большее количество незрелых, чем зрелых АРС (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:

- (a) 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 PRCLTRYYSSFVNME 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 лечение 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, наблюдавшегося 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 супрессировать уже имеющуюся иммунную реакцию на FVIII. Термин "супрессия" 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, секрецирующих 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 инъецируемом виде, либо в виде жидкого раствора, либо супензии; также может быть получена твердая форма, подходящая для растворения или супенсирования 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 (высущенного 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, декстроза или глицин.

Композицию можно вводить удобным способом, таким как пероральный, внутривенный (в случае водорастворимой), внутримышечный, подкожный, подъязычный, 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 A, в частности, тяжелой гемофилией A. 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 A 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 аутоантителных 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 аутоантителами ингибиторами, достигает 25% по сравнению со значительно более низким уровнем смертности у больных с аллоантителами.

По сравнению с пациентами, у которых аллоантителный 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 сульфаниламиды, 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 FVIII 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 серединных 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	SLYISQFIIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIIARYIRLHPTHY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYSSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFLPNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQTA	RYLRI

Пример 2. Исследование ответа на пептиды HLA-DR2 рестрикованных 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 рестрикованные 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 лимфобласти 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 PPIA, 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 презентирован Т-клетке. В настоящем случае была исследована способность пептидов к презентации фиксированными АРС.

Клетки Mgar были либо свежими, либо фиксированными 1% параформальдегидом. Клоны тестировали на антигенную специфичность путем культивирования 100 мкл клеток гибридомы с 5×10^4 клеток Mgar в присутствии или отсутствие 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 презентирован живыми клетками Mgar, демонстрирует то, что для презентации интактного белка требуется процессирование антигена. Пептиды DNIMV и PRCLT с одной стороны презентируются как живыми, так и фиксированными клетками Mgar, 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 суппрессии 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 суппрессии 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 сцинтиляционный 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 $TCR\alpha\beta$ сливющимися 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 плоскодонные 96-луночные планшеты в течение 2 дней перед добавлением среды НАТ 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 НАТ. Клоны подращивали в среде НАТ в течение по меньшей мере 2 недель до переноса в среду НТ, а затем в полную среду. Клоны тестировали на антигенную специфичность путем культивирования 100 мкл гибридомных клеток с 5×10^4 клеток Mgar в присутствии или отсутствие 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, считающими 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 МНС 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 МНС класса II, вводили 3 раза 100 мкг DNIMV, PRCLT или PPIA, 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 тимицина, 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 МНС 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 mqielfstoff lclirfcfsa tmyylgave lswdymqsdsl gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvylkttif veftdhifnl akprppwmgli lgptiqaevy dtvilitkrm ashpvslihav
 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpq gshtyywqvl kengpmasdp lctisytlsh
 181 vdlvkdlnsg ligalvcre gislakektqt lhkfillfav fdegkswhse tkslsmqdrd
 241 aaseraawpkm htvngyvnr s lpglgchrl svywhvigmgttpevhslf eghiflvmh
 301 rqaesleispi tfttaqtlim d lqgqflfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlmknne
 361 eaedyydddt dsemdvvrfd ddnspsfci rsvakkhpkt wvhyiaaeee cwdyapvia
 421 pddrsyksqy lnngpqnigr kydkvrmay tdefkrtrea lqhesgllgp llygevgdtl
 481 liifkngasj pnyiyphgit dvrplysrj pkgykhkdf pilpgeifky kwtvivedgp
 541 tksdprctr ysssfvnmr diasglgpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvide
 601 nrswlyteni qrlfnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlslqlsvcl hevaywyls
 661 igaqtdflsv ffsqytfchik myvedttif pfsgetvfm s menpgflwg chnsdfmrg
 721 mtaikvssc dktntgdyed syedisayl sknnaiereps fsqnsrhpst rkqfnattt
 781 pendiektdp wfahrtompk lqnvsssdli mlrlqspthp g lslsdlqea kyefsfddps
 841 pgaidsnnsi semthfrpql hhsgdmvftp esglqlirne klgtaatei kkldfkvsst
 901 snnlisitps dniaagdntt s lsgppsmvp hydsqldtt f gkksplte sggpilissee
 961 nndsklesg lmnssqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alitkdnalif kvsisllkn
 1021 ktsnnsatn rthidgssl ienspsvwqql ilestdtefkk vtplihdnni mdknatalr
 1081 nhmsnktss knmnemvqklt egpppdaqn pdmstfkmif ipesarwqqr thgknslnsg
 1141 qgpsepkjvs lgpeksvegg nfsekknkv vkggeftkdv gikemvfpss miftnldn
 1201 lhen nthnqe kkqeeiekk etliqenwvi pqjhtvlgktr nfmknflis trqnvegpsyd
 1261 gayapvlgdf rshndstnrt kkhthahfskk g eeenleglg nqtkqiveky acitrispt
 1321 sqqnftiqr s kraikqfrip leetelekr i vddtstqws knmkhltpst ftqidyneke
 1381 kga lqspis dcitrsheip qanrsplpia kvssfpsirp lytrvlfqd nsshlpaaasy
 1441 rckdsqvgqes shfqqgakkn nslalitie mtgdqrevgs lgttsatnsvt ykkventvlp
 1501 kpdplkptsgk vellpkvhiy qkdlfptets ngsphgldv egslqgtag eikwneanrp
 1561 gkvpfrvat essaktpskl ldpiawdnhy gtqipkeewk sqekspketa fkkkdtlsl
 1621 nacesnhai ainegnokpke ievtwakqgr terlcsqnpv v lkrhqrerit tttqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqspstf qkktrhyfia avertwdygm sssphvilmr
 1741 aqsgsvpqf k vvfqeftdg stqplyrge lnehlglgp yiraavedni mvtfrnqasr
 1801 p ysfyssis yeedqrqgae prknfvkpn tktlyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhegl igpllvchtn tnpahgrov tvqefalifft ifdetkswyf temmernra
 1921 poniqmedpt fkenyfhai ngyimdtipg lvmadqdnir wylsmgsne nihsihfsgh
 1981 vftvrkkeeey kmalynlypg v fetvemlps kagiwrveci i gehlhagms tiflvsnkc
 2041 qtpigmasgh irdfqitaseg qyggwakpli rhyhsgsina wstkepfsi kvdliapmli
 2101 hgikttqarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnsg tlmvffignvd ssgikhniif
 2161 ppiaryiri hthysirst lrmewmgcdl ncsmpigme skaisdaqit assyftnmfa
 2221 twspskarh lqgrsnawrp qvnnpkewi q vofqkumkv t gvttqgvksl ltsmyvkef
 2281 lsssqdghqw tifqngkvk vfaqgnqdsft p vvnslppl ltrylrihpq swvhqiairm
 2341 evlgceaqdl y

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

1.	473-488	YGEVGDTLLIIFKNQ
2.	474-489	GEVGDTLLIIFKNQA
3.	475-490	EVGDTLLIIFKNQAS
4.	476-491	VGDTLLIIFKNQASR
5.	477-492	GDTLLIIFKNQASRP
6.	478-493	DTLLIIFKNQASRPY
7.	479-494	TLLIIFKNQASRPYN
8.	480-495	LLIIFKNQASRPYNI
9.	481-496	LIIFKNQASRPYNIT
10.	482-497	IIFKNQASRPYNITP
11.	483-498	IFKNQASRPYNITPH

Перекрывающийся набор для PRCLTRYYSSFVNME

1.	540-554	PTKSDPRCLTRYYSS
2.	541-555	TKSDPRCLTRYYSSF
3.	542-556	KSDPRCLTRYYSSFV
4.	543-557	SDPRCLTRYYSSFVN
5.	544-558	DPRCLTRYYSSFVN
6.	545-559	PRCLTRYYSSFVNME
7.	546-560	RCLTRYYSSFVNME
8.	547-561	CLTRYYSSFVNMER
9.	548-562	TRYYSSFVNMERDL
10.	549-563	TRYYSSFVNMERDLA
11.	550-564	RYYSSFVNMERDLAS

Перекрывающийся набор для DNIMVTFRNQASRPY

1. 1783-1797	RAEVEDNIMVTFRNQ
2. 1784-1798	AEVEDNIMVTFRNQA
3. 1785-1799	EVEDNIMVTFRNQAS
4. 1786-1800	VEDNIMVTFRNQASR
5. 1787-1801	EDNIMVTFRNQASRP
6. 1788-1802	DNIMVTFRNQASRPY
7. 1789-1803	NIMVTFRNQASRPYS
8. 1790-1804	IMVTFRNQASRPYSF
9. 1791-1805	MVTFRNQASRPYSFY
10. 1792-1806	VTFRNQASRPYSFYS
11. 1793-1807	TFRNQASRPYSFYS

Перекрывающийся набор для SLYISQFIIIMYSLDG

1. 2109-2123	RQKFSSLYISQFIIIM
2. 2110-2124	QKFSSLYISQFIIIMY

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 PPIIARYIIRLHPTHY

1. 2156-2170	HNIFNPPPIIARYIIRL
2. 2157-2171	NIFNPPPIIARYIIRLH
3. 2158-2172	IFNPPPIIARYIIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIIARYIIRLHPT
5. 2160-2174	NPPPIIARYIIRLHPTH
6. 2161-2175	PPIIARYIIRLHPTHY
7. 2162-2176	PPIIARYIIRLHPTHYS
8. 2163-2177	IARYIIRLHPTHYSI
9. 2164-2178	IARYIIRLHPTHYSIR
10. 2165-2179	ARYIIRLHPTHYSIRS
11. 2166-2180	RYIIRLHPTHYSIRST

Перекрывающийся набор для RYLRIPHQS WVHQIA

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, состоящий из одной из следующих последовательностей:

PRCLTRYYSSFVNME
 VEDNIMVTFRNQASR
 DNIMVTFRNQASRPY
 IMVTFRNQASRPYSF
 MVTFRNQASRPYSFY
 VTFRNQASRPYSFYS
 TKSDPRCLTRYYSSF
 KSDPRCLTRYYSSFV
 SDPRCLTRYYSSFVN
 DPRCLTRYYSSFVN
 RCLTRYYSSFVNMER
 CLTRYYSSFVNMERD
 PPIIARYIIRLHPTHY
 PIIARYIIRLHPTHYS
 ARYIIRLHPTHYSIRS
 GDTLLIIFKNQASRP
 DTLLIIFKNQASRPY
 TLLIIFKNQASRPYN
 RQKFSSLYISQFIIM
 QKFSSLYISQFIIMY
 PPLLTRYLRIHPQSW
 PLLTRYLRIHPQSWV
 RYLRIPHQS WVHQIA
 YLRIHPQSWVHQIAL
 LRIHPQSWVHQIALR

способный предотвратить образование антител в отношении фактора VIII in vivo.

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

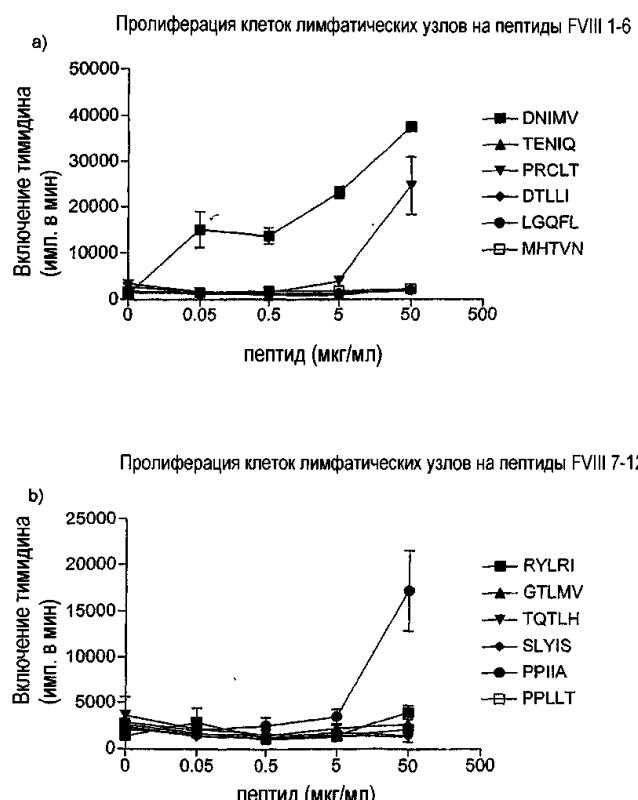
3. Пептид по п.1 или композиция по п.2 в лечении гемофилии у индивидуума.

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-

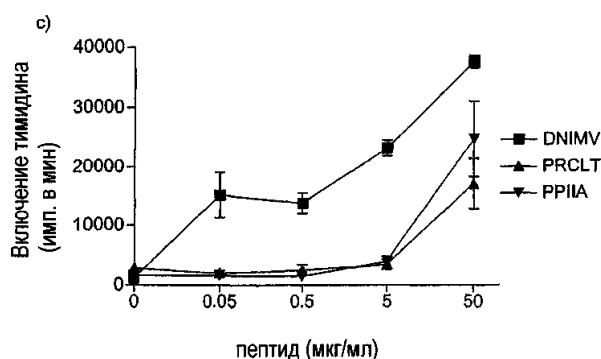
тия этого заболевания.

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

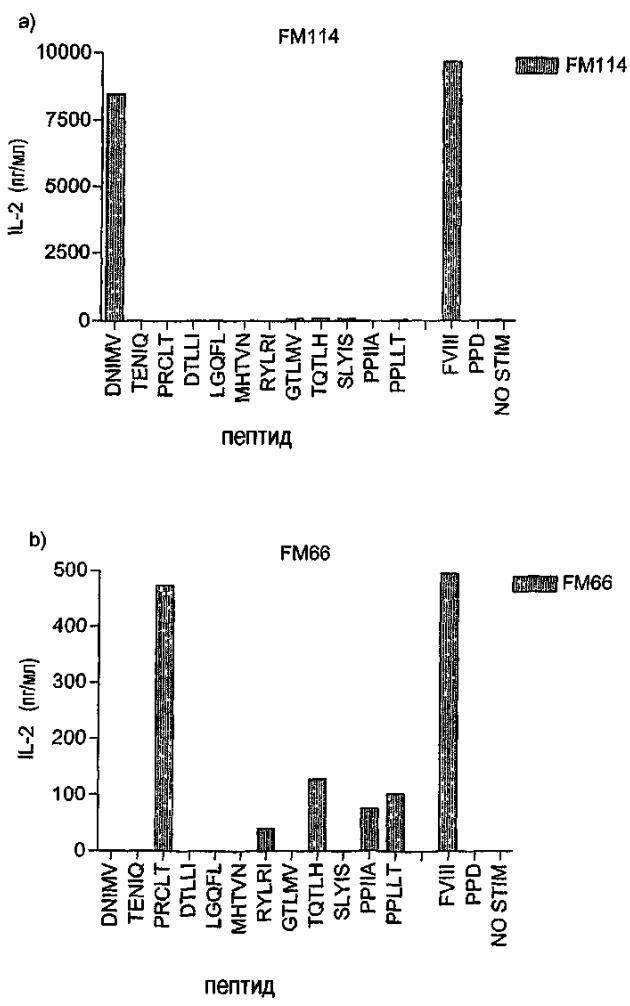


Фиг. 1

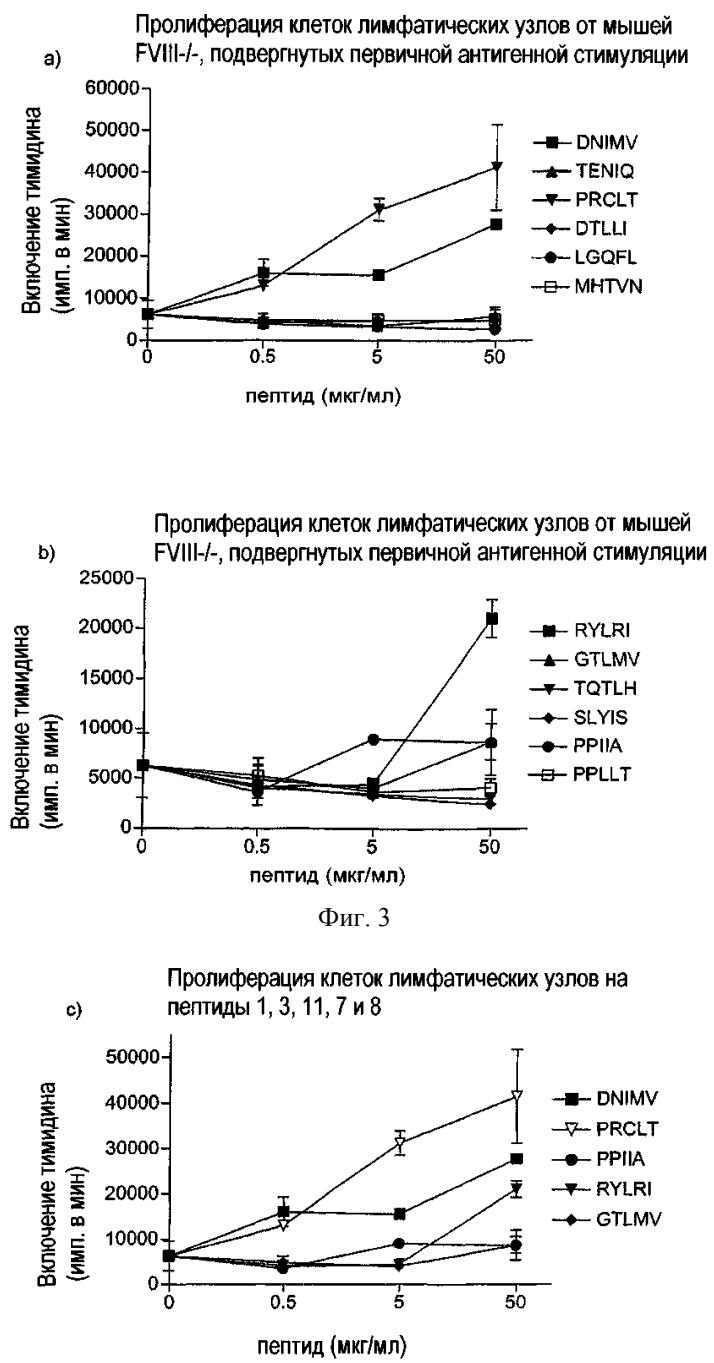
Пролиферация клеток лимфатических узлов на пептиды FVIII 1, 3 и 11



Фиг. 1 (Продолжение)

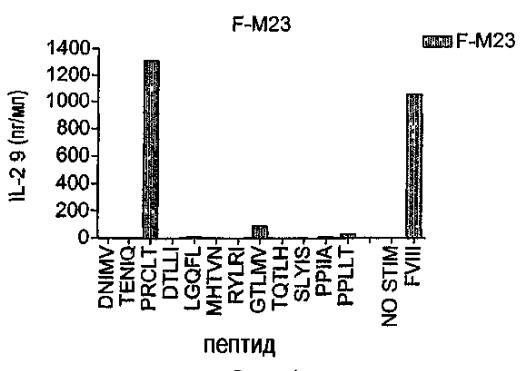
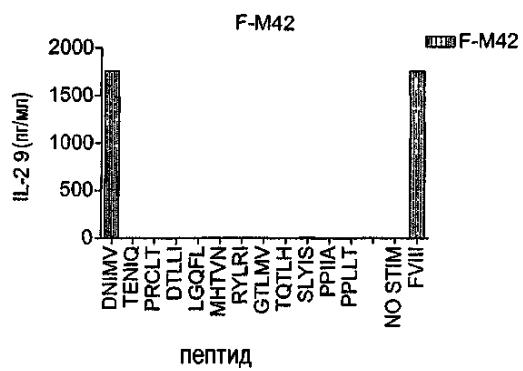


Фиг. 2

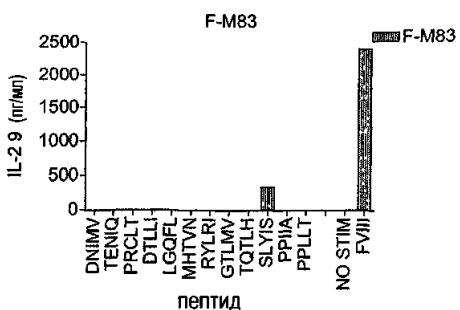
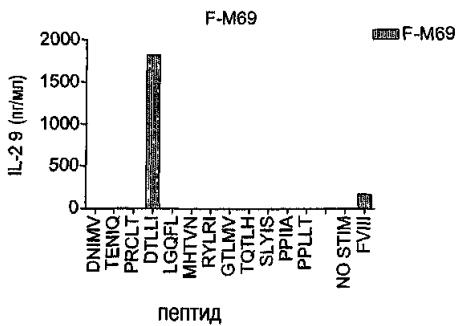


Фиг. 3

Фиг. 3 (Продолжение)

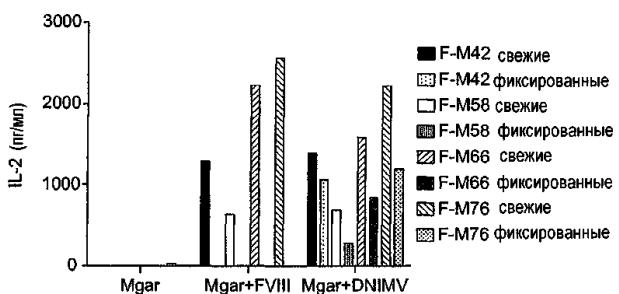


Фиг. 4

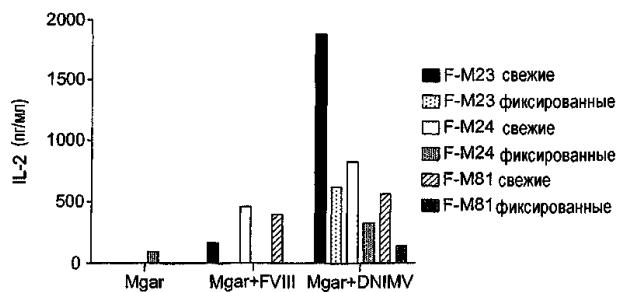


Фиг. 4 (Продолжение)

FVIII-/ клонны, специфичные в отношении DNIMV

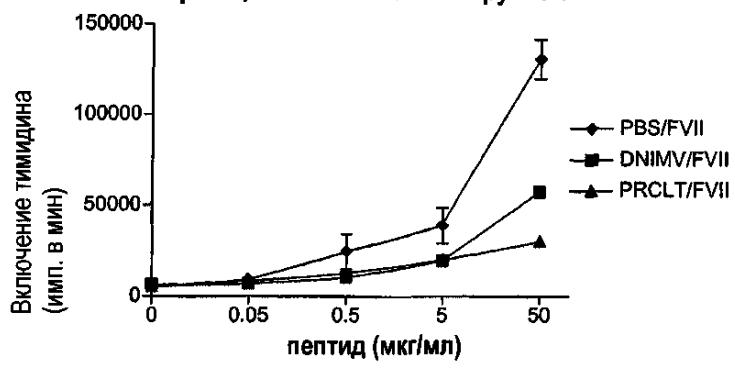


FVIII-/ клонны, специфичные в отношении PRCLT



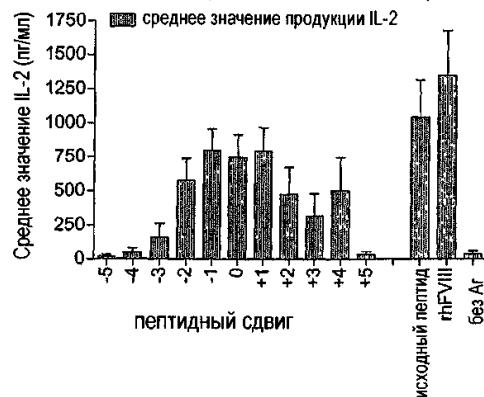
Фиг. 5

реакции на FVIII во всех группах



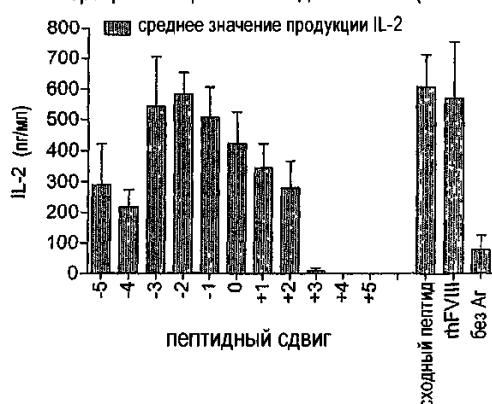
Фиг. 6

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



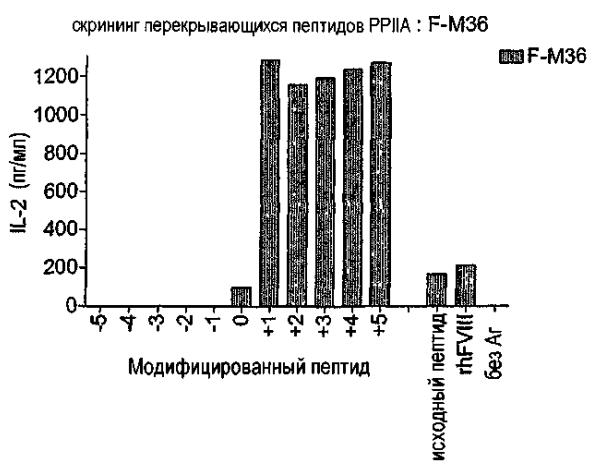
Фиг. 7а

Среднее значение продукции IL-2 для перекрывающихся пептидов PRCLT (4 клона)

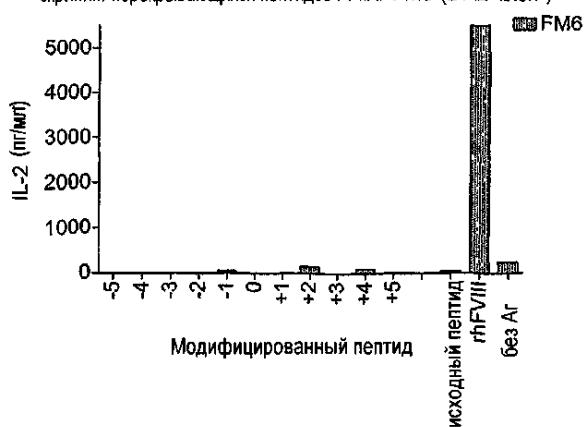


Фиг. 7b

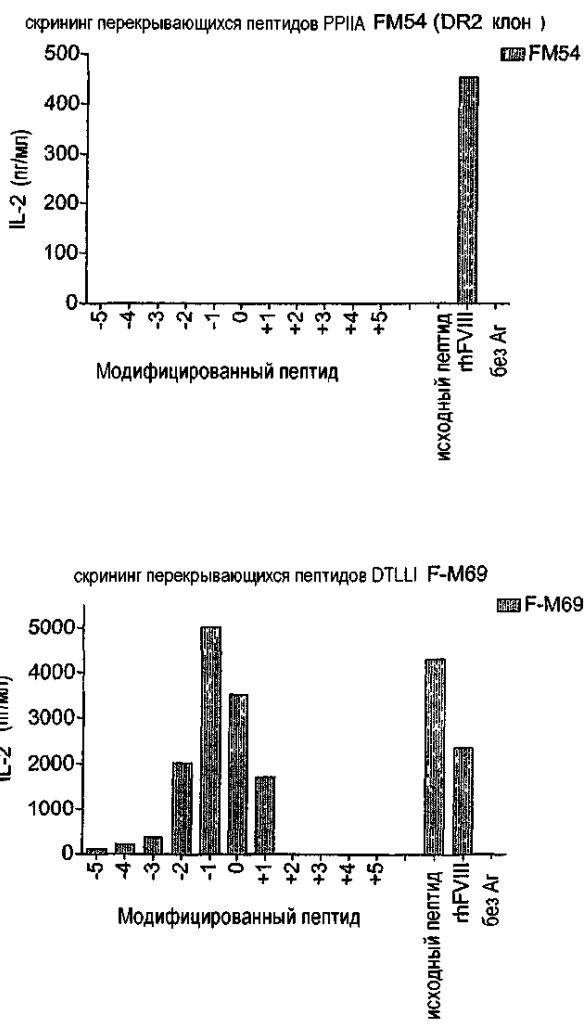
Среднее значение продукции IL-2 для перекрывающихся пептидов
PPIIA, DTLLI, SLYIS и RYRLI



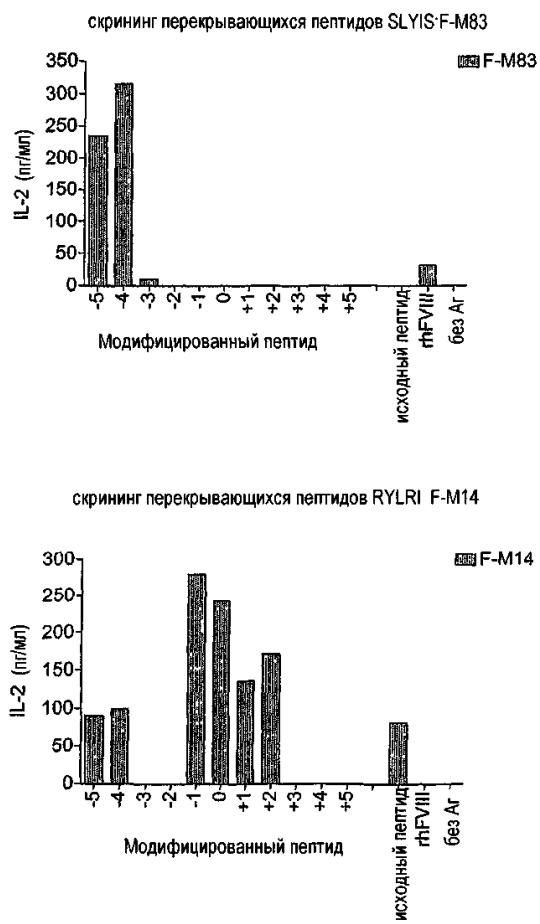
скрининг перекрывающихся пептидов PPIIA: F-M36 (DR2 клон)



Фиг. 7C

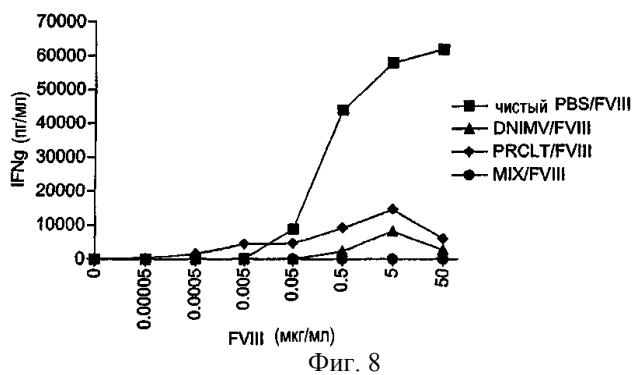


Фиг. 7С (Продолжение)



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 ВОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЙ
 <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 Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

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 Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815

 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830

 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845

 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860

 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880

 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895

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

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

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

 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

019370

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 Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser
1400 1405 1410

Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe
 1415 1420 1425

 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 Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys
 1610 1615 1620

 Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys
 1625 1630 1635

 Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
 1640 1645 1650

Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu
 1655 1660 1665

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 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 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 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 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	

<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

