

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2010.05.17	(73) Titular(es): APITOPE INTERNATIONAL NV AGORALAAN, GEB. A BIS 3590 DIEPENBEEK BE
(30) Prioridade(s): 2009.05.18 GB 0908515	
(43) Data de publicação do pedido: 2012.06.20	(72) Inventor(es): DAVID WRAITH GB
(45) Data e BPI da concessão: 2014.10.01 235/2014	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS DERIVADOS DE FVIII E SEU USO NA TOLERIZAÇÃO DE HEMOFÍLICOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA PÉPTIDOS PELO MENOS PARCIALMENTE DERIVÁVEIS DE FVIII QUE SÃO CAPAZES DE SE LIGAREM A UMA MOLÉCULA DE CLASSE II DO MHC SEM PROCESSAMENTO DE ANTIGÉNIO ADICIONAL E SENDO RECONHECIDOS POR UMA CÉLULA T ESPECÍFICA DO FATOR VIII. EM PARTICULAR, A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM PÉPTIDO COMPREENDENDO A OU CONSISTINDO NA SEQUÊNCIA EDNIMVTFRNQASR. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE RELACIONA COM O USO DE UM TAL PÉPTIDO PARA A PREVENÇÃO OU SUPRESSÃO DA FORMAÇÃO DE ANTICORPOS INIBIDORES NA HEMOFILIA A E/OU HEMOFILIA ADQUIRIDA.

RESUMO

“PÉPTIDOS DERIVADOS DE FVIII E SEU USO NA TOLERIZAÇÃO DE HEMOFÍLICOS”

A presente invenção proporciona péptidos pelo menos parcialmente deriváveis de FVIII que são capazes de se ligarem a uma molécula de classe II do MHC sem processamento de antigénio adicional e sendo reconhecidos por uma célula T específica do fator VIII. Em particular, a presente invenção proporciona um péptido compreendendo a ou consistindo na sequência EDNIMVTFRNQASR. A presente invenção também se relaciona com o uso de um tal péptido para a prevenção ou supressão da formação de anticorpos inibidores na hemofilia A e/ou hemofilia adquirida.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS DERIVADOS DE FVIII E SEU USO NA TOLERIZAÇÃO DE HEMOFÍLICOS"

Área da Invenção

A presente invenção relaciona-se com um péptido. Em particular, relaciona-se com um péptido que é derivável do fator VIII (FVIII). Os péptidos podem ser usados para reduzir ou prevenir a formação de anticorpos inibidores do fator VIII, por exemplo no tratamento da hemofilia A e hemofilia adquirida.

Antecedentes da Invenção

Hemofilia

A hemofilia pertence a um grupo de distúrbios sanguíneos hereditários que inclui hemofilia A, hemofilia B (doença de Christmas) e doença de Von Willenbrand.

Na hemofilia, a capacidade do sangue de coagular é gravemente reduzida porque um fator de coagulação essencial está parcialmente ou completamente em falta, resultando em tempo de hemorragia aumentado. A Hemofilia A é uma deficiência do fator de coagulação VIII, ao passo que a Hemofilia B é uma deficiência do fator de coagulação IX. Em ambas as doenças, o gene deficiente é encontrado no cromossoma X, logo as condições são ligadas em X. A hemofilia A é cinco vezes mais comum do que a hemofilia B.

A hemofilia é uma condição genética hereditária vitalícia, que afeta mulheres como transportadoras e homens que herdam a condição. Cerca de um terço dos novos diagnósticos são onde não existe nenhuma história familiar prévia. Aparece

globalmente e ocorre em todos os grupos raciais. Cerca de 6.000 pessoas são afetadas com hemofilia no RU.

Os hemofílicos sangram durante um período prolongado após lesão. Lesões externas tais como cortes e arranhões não representam usualmente problemas graves: é frequentemente possível parar a hemorragia por aplicação de um grau de pressão e cobertura da área afetada (p.ex. com um penso).

O principal problema é hemorragia interna nas articulações, músculos e tecidos moles, que pode ocorrer espontaneamente. A hemorragia interna, tal como o são hemorragias no cérebro, é muito difícil de gerir e pode ser fatal. A hemorragia repetida nas articulações causa dor aguda e pode causar artrite e/ou danos nas articulações a longo prazo levando a incapacidade.

O tratamento da hemofilia é usualmente por substituição do fator de coagulação em falta. Na hemofilia ligeira ou moderada, podem ser dadas injeções quando ocorre uma hemorragia (terapia a pedido). No entanto, na hemofilia grave, são dadas injeções profiláticas regulares para ajudar o sangue a coagular e minimizar a probabilidade de danos nas articulações a longo prazo.

Uma complicação potencialmente séria da terapia de substituição do fator de coagulação na hemofilia A é o desenvolvimento de anticorpos que neutralizam a função pró-coagulante do fator VIII. Os inibidores do fator VIII ocorrem em aproximadamente 25% daqueles com hemofilia A grave. Uma vez que pacientes com hemofilia A congénita podem ser geneticamente deficientes em FVIII, a síntese de inibidores é uma resposta aloimune à proteína estranha administrada para prevenir ou tratar episódios de hemorragia.

As células T CD4⁺ desempenham um papel central na resposta imune a FVIII. Após ser absorvido por células apresentadoras de antígeno (APCs), o FVIII sofre degradação proteolítica em fragmentos de péptido (Reding *et al* (2006) *Haemophilia* 12(sup 6) 30-36). Estes péptidos são depois apresentados na superfície das APC em associação com moléculas de classe II do MHC. Este complexo é depois reconhecido pelo recetor de células T de uma célula CD4⁺ específica para FVIII. Na presença dos sinais coestimuladores apropriados, este reconhecimento faz com que em última instância a célula CD4⁺ dirija a síntese de anticorpos por células B.

A incidência da formação de inibidores aumenta inicialmente com o número de tratamentos com fator VIII, mas parece estabilizar após 50-100 dias de exposição. A formação de inibidores é muito mais comum na hemofilia grave do que na doença moderada ou ligeira e alguns defeitos moleculares, o mais claramente grandes deleções e mutações sem sentido na cadeia leve do fator VIII, parecem predispor para formação de inibidores. Parâmetros tais como a concentração, tipo (purificado ou recombinante) do fator de substituição, e história de tratamento podem também afetar a probabilidade de produção de anticorpos.

A gestão de pacientes com hemofilia com inibidores é um desafio contínuo. A indução de tolerância imune (ITI) usando uma técnica de dessensibilização é bem-sucedida em alguns pacientes com aloanticorpos contra o fator VIII. Esta abordagem terapêutica requer exposição contínua a terapia de substituição do fator, logo é uma estratégia a longo prazo.

Embora a ITI possa ser bem-sucedida, uma proporção significativa (cerca de 30%) dos pacientes não responde à

ITI. É muito menos provável que pacientes com elevados títulos de inibidores respondam ao tratamento. Outro fator contribuinte significativo é a idade no início da ITI inicial, com taxas de sucesso grandemente diminuídas quando o paciente tem mais do que 20 anos (Hay *et al* (2005) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32:15-21).

Quando a terapia de ITI é malsucedida, o inibidor persiste geralmente ao longo da vida, e porque tais pacientes são usualmente respondedores elevados, é necessário tratar episódios de hemorragia com produtos evitando FVIII, tais como concentrados de complexo de protrombina ativado (FEIBA™), e FVII ativado recombinante. No entanto, o uso de tais agentes está associado a eventos adversos tais como coagulação intravascular disseminada, enfarte agudo do miocárdio, embolia pulmonar e trombozes (Acharya e DiMichele (2006) *Best Practice & Research Clinical Haematology* 19:51-66).

A terapia imunossupressora é por vezes usada para pacientes que não respondem à ITI. O tratamento inclui administração de fármacos imunossupressores tais como ciclofosfamida, prednisona, azatioprina e ciclosporina que se direcionam não especificamente para o sistema imune. Estes tratamentos podem ter efeitos secundários associados a imunossupressão geral.

Existe interesse renovado na depleção de células B seletiva usando Rituximab™, um anticorpo monoclonal humanizado para o antígeno CD20 de células B. No entanto, reações de infusão, doença do soro e infeções oportunistas têm ocorrido em algumas crianças tratadas com este fármaco (DiMichele (2007) *J Thromb Haemost* 5:143-50).

Hemofilia Adquirida

A hemofilia adquirida é uma condição autoimune rara que afeta entre 1 e 4 pessoas em cada milhão. Nesta condição, os sujeitos que não nascem com hemofilia desenvolvem anticorpos contra um dos fatores de coagulação tais como fator VIII. Pensa-se que a gravidez e as doenças autoimunes tais como artrite reumatoide e cancro podem aumentar o risco de desenvolver hemofilia adquirida. Embora existam diferenças nos mecanismos imunes subjacentes levando à sua produção, as manifestações clínicas de inibidores de FVIII produzidas em resposta à terapia de substituição do fator de coagulação e aquelas produzidas na hemofilia adquirida são similares.

Os pacientes hemofílicos adquiridos têm uma taxa de mortalidade que se aproxima de 25%, parcialmente devido à associação de inibidores adquiridos a complicações de hemorragia graves. A terapia de inibidores de autoanticorpos adquiridos é baseada principalmente na necessidade de controlo ou prevenção de complicações hemorrágicas agudas, que são frequentemente fatais ou graves para os membros e em segundo lugar de erradicação do autoanticorpo para restaurar a coagulação normal.

Algumas hemorragias associadas a inibidores de autoanticorpos com baixo título (<5 Unidades Bethesda) podem ser tratadas eficazmente com concentrados de FVIII administrados em elevadas doses. O concentrado de FVIII de suíno era anteriormente considerado uma terapia de primeira linha crítica para hemorragia relacionada com hemofilia adquirida uma vez que era a única terapia de substituição que proporcionava uma oportunidade de medir de facto níveis de atividade de coagulação de FVIII pós-infusão no laboratório. O produto foi removido do mercado em 2004 devido a contaminação dos conjuntos de plasma de suíno pelo

parvovírus de suíno. Agora, agentes de "bypass" são o mais comumente usados, mas existem riscos potenciais de trombogenicidade e existe somente cerca de 80% de eficácia para cada produto. A mudança de plasma por plasmaférese e a imunoadsorção extracorpórea podem ser necessárias para reduzir temporariamente o título de inibidor o suficiente para evitar agentes ou substituição de FVIII para proporcionar hemostasia adequada.

A erradicação de inibidores de autoanticorpos depende de medidas imunossupressoras, tais como: (1) administração de corticosteroides com 30%-50% de eficácia em 3-6 semanas; (2) uso de agentes quimioterapêuticos citotóxicos e mielossupressores, p.ex., ciclofosfamida, ciclosporina, 2-clorodeoxiadenosina; (3) imunomodulação com imunoglobulina intravenosa; e (4) depleção de linfócitos B seletiva com Rituximab. Os respondedores a Rituximab™ podem requerer uso concomitante de esteroides e as recaídas podem responder a retratamento.

WO 02/060917 relaciona-se com péptidos do fator VIII isolados e purificados e suas variantes, bem como ADN codificando esses péptidos.

Assim sendo, todos os métodos correntemente disponíveis para redução da produção de aloanticorpos associada a tratamento da hemofilia A, e da produção de autoanticorpos na hemofilia adquirida, têm falhas. Existe portanto uma necessidade de métodos melhorados para ter em conta a questão de anticorpos anti-FVIII na hemofilia A e hemofilia adquirida.

Os presentes inventores descobriram que é possível prevenir a formação de anticorpos inibidores de FVIII por pré-tolerização do paciente com péptidos derivados de FVIII.

Sumário de Aspetos da Invenção

O péptido do primeiro aspeto da invenção consiste na sequência EDNIMVTFRNQASR.

Num segundo aspeto, a presente invenção proporciona uma composição, tal como uma composição farmacêutica compreendendo uma pluralidade de péptidos incluindo um péptido do primeiro aspeto da invenção. A composição pode compreender uma pluralidade de péptidos totalmente ou parcialmente deriváveis de FVIII que são capazes de induzirem ou restaurarem tolerância ao FVIII.

A composição pode estar na forma de um conjunto, no qual a pluralidade de péptidos é proporcionada separadamente para administração separada, subsequente, sequencial ou simultânea.

O péptido ou uma composição da invenção pode ser para uso na supressão, redução, ou prevenção do desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII.

É descrito aqui o uso de um tal péptido ou composição no fabrico de um medicamento para suprimir, reduzir ou prevenir o desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII.

É também descrito aqui um método para supressão, prevenção ou redução do desenvolvimento de anticorpos inibidores do Fator VIII num sujeito, que compreende o passo de administração de um tal péptido ou composição ao sujeito.

O sujeito pode ser deficiente em FVIII. Em particular, o sujeito pode ter hemofilia A, e pode estar, ou estar prestes, a ser submetido a terapia de substituição do fator VIII.

Alternativamente, o sujeito pode ter, ou estar em risco de contrair, hemofilia adquirida.

Os inibidores do fator VIII são encontrados mais frequentemente em indivíduos expressando HLA-DR2. O sujeito tratado pelo método da invenção pode portanto ser positivo quanto a HLA-DR2.

Figura 9: Respostas de camundongos ingênuos ou tolerizados estimulados com EDNIMVTFRNQASR (EDNIMV) ou um péptido de controlo (DNIMV).

Descrição das Figuras

Figura 1: Respostas de recordação para células de linfonodos (LNC) de camundongos FVIII+DR2+ imunizados com rhFVIII/CFA

- a) Proliferação de LNC para péptidos 1-6 do FVIII
- b) Proliferação de LNC para péptidos 7-12 do FVIII
- c) Proliferação de LNC para péptidos 1, 3 e 11 do FVIII

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

Figura 3: Respostas de recordação para LNC de camundongos FVIII-DR2+ imunizados com rhFVIII/CFA

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

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

Figura 6: Respostas de recordação para LNC de camundongos FVIII+DR2+ tratados 3x i.p. com péptido antes de imunização com rhFVIII/CFA.

Figura 7: Determinação da gama de epítomos de péptido capazes de funcionar como apítomos usando clones de hibridoma de células T FVIII-DR2+ específicos para péptidos sobrepostos derivados de FVIII. O péptido original é denominado 0. Uma mudança de aminoácido na direção do terminal N é -1, duas mudanças de aminoácidos na direção do terminal N é -2, etc. Uma mudança na direção do terminal C é +1, etc.

Figura 8: Produção de IFN-gama de células de linfonodos em resposta a FVIII para camundongos FVIII-DR2+ tratados com péptidos derivados de FVIII PRCLT, DNIMV ou uma mistura de ambos.

Figura 9: Respostas de camundongos ingênuos ou tolerizados estimulados com EDNIMVTFRNQASR (EDNIMV) ou um péptido de controlo (DNIMV).

Descrição Detalhada

Péptido

A presente invenção relaciona-se com um péptido.

O termo "péptido" é usado no sentido normal para significar uma série de resíduos, tipicamente L-aminoácidos, conectados um ao outro tipicamente por ligações peptídicas entre os grupos α -amino e carboxilo de aminoácidos

adjacentes. O termo inclui péptidos modificados e análogos de péptido sintéticos.

O péptido da presente invenção pode ser feito usando métodos químicos (*Peptide Chemistry, A practical Textbook*. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlim.). Por exemplo, os péptidos podem ser sintetizados por técnicas de fase sólida (Roberge JY *et al* (1995) *Science* 269: 202-204), clivados da resina, e purificados por cromatografia líquida preparativa de elevado desempenho (p.ex., Creighton (1983) *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co, Nova Iorque, NI). Pode ser alcançada síntese automatizada, por exemplo, usando o Sintetizador de Péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) de acordo com as instruções proporcionadas pelo fabricante.

O péptido pode ser alternativamente feito por meios recombinantes, ou por clivagem de um péptido do fator VIII seguida por modificação de uma ou ambas as extremidades. A composição de um péptido pode ser confirmada por análise ou sequenciação de aminoácidos (p.ex., o procedimento de degradação de Edman).

Para propósitos práticos, existem várias outras características que o péptido pode mostrar. Por exemplo, é importante que o péptido seja suficientemente estável *in vivo* para ser terapeuticamente útil. A meia-vida do péptido *in vivo* pode ser pelo menos 10 minutos, 30 minutos, 4 horas, ou 24 horas.

O péptido pode também demonstrar boa biodisponibilidade *in vivo*. O péptido pode manter uma conformação *in vivo* que permite que ele se ligue a uma molécula do MHC na superfície da célula sem impedimento devido.

EPÍTOPOS DE PÉPTIDO

Numa resposta imune adaptativa, os linfócitos T são capazes de reconhecer epítopos internos de um antigénio de proteína. As células apresentadoras de antigénio (APC) absorvem antigénios de proteína e degradam-os em pequenos fragmentos de péptido. Um péptido pode ligar-se a uma molécula de classe I ou II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) dentro da célula e pode ser transportado para a superfície da célula. Quando apresentado à superfície da célula em conjunto com uma molécula do MHC, o péptido pode ser reconhecido por uma célula T (através do recetor de células T (TCR)), caso em que o péptido é um epítipo de células T.

Um epítipo é assim um péptido derivável de um antigénio que é capaz de se ligar ao sulco de ligação do péptido de uma molécula de classe I ou II do MHC e ser reconhecido por uma célula T.

O epítipo mínimo é o fragmento mais curto derivável de um epítipo, que é capaz de se ligar ao sulco de ligação do péptido de uma molécula de classe I ou II do MHC e ser reconhecido por uma célula T. Para uma dada região imunogénica, é tipicamente possível gerar um "conjunto aninhado" de péptidos sobrepostos que atuam como epítopos, todos os quais contêm o epítipo mínimo, mas diferem nas suas regiões flanqueantes.

Pela mesma razão, é possível identificar o epítipo mínimo para uma combinação molécula do MHC:célula T particular por medição da resposta a péptidos truncados. Por exemplo, se é obtida uma resposta ao péptido compreendendo os resíduos 1-15 na biblioteca sobreposta, podem ser usados conjuntos que sejam truncados em ambas as extremidades (i.e. 1-14, 1-13,

1-12, etc. e 2-15, 3-15, 4-15, etc.) para identificar o epítipo mínimo.

Apítopos

Os presentes inventores determinaram previamente que existe uma ligação entre a capacidade de um péptido de se ligar a uma molécula de classe I ou II do MHC e ser apresentado a uma célula T sem processamento do antígeno adicional, e a capacidade do péptido de induzir tolerância *in vivo* (WO 02/16410). Se um péptido for demasiado longo para se ligar ao sulco de ligação do péptido de uma molécula do MHC sem processamento adicional (p.ex. encurtamento), ou se ligar numa conformação inadequada, então não será tolerogénico *in vivo*. Se, por outro lado, o péptido for de um tamanho e conformação adequados para se ligar diretamente ao sulco de ligação do péptido do MHC e ser apresentado a uma célula T, então pode-se prever que este péptido seja útil para indução da tolerância.

É assim possível investigar a capacidade tolerogénica de um péptido por investigação se se consegue ligar a uma molécula de classe I ou II do MHC e ser apresentado a uma célula T sem processamento de antígeno adicional *in vitro*.

O péptido da presente invenção é um apítopo (epíTOPOS Independentes do Processamento de Antígenos) na medida em que é capaz de se ligar a uma molécula de classe II do MHC e estimular uma resposta de células T específicas do fator VIII sem processamento de antígeno adicional. Pode ser previsto que tais apítopos causem tolerância ao FVIII, seguindo o método baseado em regras descrito em WO02/16410.

Os péptidos que se ligam a moléculas de classe I do MHC têm tipicamente 7 a 13, mais usualmente 8 a 10 aminoácidos de

comprimento. A ligação do péptido é estabelecida nas suas duas extremidades por contactos entre átomos na cadeia principal do péptido e locais invariantes no sulco de ligação do péptido de todas as moléculas de classe I do MHC. Existem locais invariantes em ambas as extremidades do sulco que se ligam aos terminais amino e carboxi do péptido. Variações no comprimento do péptido são acomodadas por uma dobra da estrutura principal do péptido, frequentemente nos resíduos de prolina e glicina que permitem a flexibilidade requerida.

Os péptidos que se ligam a moléculas de classe II do MHC têm tipicamente entre 8 a 20 aminoácidos de comprimento, mais usualmente entre 10 e 17 aminoácidos de comprimento, e podem ser mais longos (por exemplo, até 40 aminoácidos). Estes péptidos estão numa conformação estendida ao longo do sulco de ligação do péptido II do MHC que (ao contrário do sulco de ligação do péptido de classe I do MHC) está aberto em ambas as extremidades. O péptido é mantido em posição principalmente por contactos de átomos da cadeia principal com resíduos conservados que delineiam o sulco de ligação do péptido.

APIPS

São conhecidos vários sistemas de apresentação independentes do processamento de antigénio (APIPS), incluindo:

- a) APC fixas (com ou sem anticorpos para CD28);
- b) Membranas lipídicas contendo moléculas de Classe I ou II do MHC (com ou sem anticorpos para CD28); e
- c) MHC natural ou recombinante purificado na forma ligada a placa (com ou sem anticorpos para CD28).

Todos estes sistemas são capazes de apresentar antigénio em conjunto com uma molécula do MHC, mas são incapazes de processar antigénio. Em todos estes sistemas, a função de processamento está ou ausente ou danificada. Isto torna possível investigar se um péptido se consegue ligar a uma molécula de classe I ou II do MHC e ser apresentado a uma célula T sem processamento de antigénio adicional.

O uso de APC fixas para investigar respostas de células T é bem conhecido na técnica, por exemplo em estudos para investigar o epítipo mínimo dentro de um polipéptido, por medição da resposta a péptidos truncados (Fairchild *et al* (1996) *Int. Immunol.* 8:1035-1043). As APC podem ser fixas usando, por exemplo, formaldeído (usualmente paraformaldeído) ou glutaraldeído.

Podem ser preparadas membranas lipídicas (que podem ser membranas planares ou lipossomas) usando lípidos artificiais ou podem ser frações da membrana planar/microsomal das APC.

Em uso, os APIPs podem ser aplicados aos poços de uma placa de cultura de tecidos. Antigénios do péptido são depois adicionados e a ligação do péptido à porção do MHC do APIPS é detetada por adição de linhas ou clones de células T selecionados. A ativação da linha ou clone de células T pode ser medida por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica, por exemplo através de incorporação de ³H-timidina ou secreção de citocinas.

Fator VIII

O péptido da invenção é derivável do fator VIII.

O fator VIII participa na via intrínseca da coagulação do sangue; o fator VIII é um cofator do fator IXa que, na presença de Ca^{2+} e fosfolípidos, converte o fator X na forma ativada Xa.

O gene do fator VIII produz dois transcritos alternativamente processados. A variante de transcrito 1 codifica uma grande glicoproteína, isoforma a, que circula no plasma e se associa ao fator de von Willebrand num complexo não covalente. Esta proteína sofre múltiplos eventos de clivagem. A variante de transcrito 2 codifica uma pequena proteína putativa, isoforma b, que consiste principalmente no domínio de ligação de fosfolípido do fator VIIIC. Este domínio de ligação é essencial para a atividade coagulante.

A sequência de 186.000 pares de bases completa do gene do fator VIII humano foi elucidada em meados de 1980s (Gitschier *et al* (1984) *Nature* 312 326-330). Ao mesmo tempo, clones de ADN codificando a sequência de 2351 aminoácidos completa foram usados para produzir fator VIII biologicamente ativo em células de mamífero cultivadas (Wood *et al* (1984) *Nature* 312:330-337). A sequência de 2.351 aminoácidos completa para o fator VIII humano é dada em SEQ ID No. 1.

Tolerância

Os epítomos de células T desempenham um papel central na resposta imune adaptativa a qualquer antigénio, quer próprio ou estranho. O papel central desempenhado por epítomos de células T em doenças de hipersensibilidade (que

incluem alergia, doenças autoimunes e rejeição de transplante) tem sido demonstrado através do uso de modelos experimentais. É possível induzir doenças inflamatórias ou alérgicas por injeção de péptidos sintéticos (com base na estrutura de epítomos de células T) em combinação com adjuvante.

Em contraste, têm-se mostrado ser possível induzir tolerância imunológica em relação a certos antigénios particulares por administração de epítomos de péptido na forma solúvel. A administração de antigénios de péptido solúveis tem sido demonstrada como um meio eficaz de inibir doença na encefalomielite autoimune experimental (EAE - um modelo para a esclerose múltipla (MS)) (Metzler e Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu e Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton e Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); e modelos experimentais de artrite, diabetes, e uveoretinite (revistos em Anderton e Wraith (1998) como acima). Isto tem sido também demonstrado como um meio de tratamento de uma doença persistente em EAE (Anderton e Wraith (1998) como acima).

A tolerância é a falha em responder a um antigénio. A tolerância a antigénios próprios é uma característica essencial do sistema imune, quando isto é perdido, pode resultar doença autoimune. O sistema imune adaptativo tem de manter a capacidade de responder a uma enorme variedade de agentes infecciosos enquanto evita ataque autoimune dos antigénios próprios contidos dentro dos seus próprios tecidos. Isto é controlado em larga medida pela sensibilidade de linfócitos T imaturos à morte apoptótica de células no timo (tolerância central). No entanto, nem todos os antigénios próprios são detetados no timo, logo a morte de timócitos autorreativos permanece incompleta. Existem assim também mecanismos pelos quais a tolerância

pode ser adquirida por linfócitos T autorreativos maduros nos tecidos periféricos (tolerância periférica). Uma revisão dos mecanismos de tolerância central e periférica é dada em Anderton *et al* (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

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

O péptido da presente invenção é capaz de induzir tolerância ao fator VIII tal que, quando o FVIII é administrado terapeuticamente, não induz uma resposta imune e não se desenvolvem inibidores do FVIII.

A hemofilia adquirida é uma doença autoimune na qual a tolerância ao fator VIII não funciona. Neste caso, o péptido da presente invenção pode ser administrado para reinstalar a tolerância a esta proteína própria e cercear a resposta imune patogénica.

A tolerância pode resultar da ou ser caracterizada pela indução de anergia em pelo menos uma porção de células T CD4+. De modo a ativar uma célula T, um péptido tem de se associar a uma APC "profissional" capaz de distribuir dois sinais às células T. O primeiro sinal (sinal 1) é distribuído pelo complexo MHC-péptido na superfície da célula da APC e é recebido pela célula T através do TCR. O segundo sinal (sinal 2) é distribuído por moléculas coestimuladoras na superfície da célula da APC, tais como CD80 e CD86, e recebido por CD28 na superfície da célula T.

Pensa-se que quando uma célula T recebe o sinal 1 na ausência do sinal 2, não é ativada e, de facto, se torna anérgica. As células T anérgicas são refratárias a desafio com antigénio subsequente, e podem ser capazes de suprimir outras respostas imunes. Pensa-se que as células T anérgicas estão envolvidas na mediação da tolerância de células T.

Sem desejar estar limitado pela teoria, os presentes inventores preveem que péptidos que requerem processamento antes de serem apresentados em conjunto com moléculas do MHC não induzem tolerância porque eles têm de ser lidados por células apresentadoras de antigénio maduras. Células apresentadoras de antigénio maduras (tais como macrófagos, células B e células dendríticas) são capazes de processamento de antigénio, mas também de distribuição de ambos os sinais 1 e 2 a uma célula T, levando à ativação de células T. Os apítopos, por outro lado, serão capazes de se ligar a classe II do MHC em APC imaturas. Assim sendo, eles serão apresentados a células T sem coestimulação, levando a anergia e tolerância de células T.

Obviamente, os apítopos serão também capazes de se ligar a moléculas do MHC na superfície da célula de APC imaturas. No entanto, o sistema imune contém uma maior abundância de APC imaturas do que maduras (foi sugerido que menos do que 10% das células dendríticas são ativadas, Summers *et al.* (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). A posição padrão de um apítopo será portanto anergia/tolerância, em vez de ativação.

A indução de tolerância ao FVIII pode ser monitorizada *in vivo* olhando para uma redução no nível de:

- (i) Anticorpos inibidores do FVIII
- (ii) Células T CD4+ específicas para FVIII
- (iii) Células B capazes de secretar anticorpos inibidores do FVIII

por técnicas conhecidas na técnica.

Mostrou-se que, quando a tolerância é induzida por administração de péptidos, a capacidade de células T CD4+ específicas de antígeno em proliferarem é reduzida. Igualmente, a produção de IL-2, IFN- γ e IL-4 por estas células é regulada por baixo, mas a produção de IL-10 é aumentada. Mostrou-se que a neutralização de IL-10 em camundongos num estado de tolerância induzida por péptidos restaura completamente a suscetibilidade à doença. Foi proposto que uma população de células reguladoras persiste no estado tolerante que produzem IL-10 e medeiam regulação imune (Burkhart *et al* (1999) *Int. Immunol.* 11:1625-1634).

A indução da tolerância pode portanto também ser monitorizada por várias técnicas incluindo:

- (a) a indução de anergia em células T CD4+ (que pode ser detetada por desafio subsequente com FVIII *in vitro*);
- (b) mudanças na população de células T CD4+, incluindo:
 - (i) redução na proliferação;
 - (ii) regulação por baixo na produção de IL-2, IFN- γ e IL-4; e
 - (iii) aumento na produção de IL-10.

Como usado aqui, o termo "tolerogénico" significa capaz de induzir tolerância.

Composição

A presente invenção também se relaciona com uma composição, tal como uma composição farmacêutica compreendendo um péptido de acordo com a invenção.

A composição pode compreender uma pluralidade de péptidos, por exemplo, dois, três, quatro, cinco ou seis péptidos da invenção.

A composição da presente invenção pode ser para uso profilático ou terapêutico.

Quando administrada para uso profilático, a composição pode reduzir ou prevenir a geração de uma resposta imune ao FVIII. O nível de resposta imune é menor do que teria sido obtido no paciente não tratado com a composição. O termo "reduzir" indica que é observada uma redução parcial na resposta imune, tal como uma redução de 50%, 70%, 80% ou 90% na resposta que teria sido observada no paciente não tratado com a composição (ou na resposta observada num paciente não tratado ao longo do mesmo período de tempo). O termo "prevenir" indica que não é observada nenhuma resposta imune apreciável ao FVIII.

Quando administrada para uso terapêutico, a composição pode suprimir uma resposta imune já em curso ao FVIII. O termo "suprimir" indica uma redução no nível de resposta imune em curso, comparado com o nível antes de tratamento de péptido, ou o nível que teria sido observado no mesmo momento se o tratamento não tivesse sido dado.

O tratamento com a composição da presente invenção pode causar uma redução nos níveis de qualquer um ou todos os seguintes:

- (i) Anticorpos inibidores do FVIII
- (ii) Células T CD4+ específicas para FVIII
- (iii) Células B secretando anticorpos inibidores do FVIII.

A detecção de todos estes fatores pode ser levada a cabo por técnicas conhecidas na técnica, tais como ELISA, FACS, etc.

O tratamento com a composição da presente invenção pode também ou alternativamente causar anergia em células T CD4+ específicas para FVIII. A anergia pode ser detetada por exemplo desafio subsequente com FVIII *in vitro*.

É importante ter em conta que nem todas as respostas imunes a FVIII são patogénicas. Anticorpos anti-FVIII não inibidores podem ser encontrados em pacientes com hemofilia sem inibidores (Moreau *et al* (2000) *Blood* 95:3435-41) e em aproximadamente 15% de dadores de sangue saudáveis (Algiman *et al* (1992) 89:3795-9).

Inibidores do FVIII podem ser detetados pela modificação de Nijmegen do ensaio de coagulação de Bethesda, no qual é usada a capacidade do plasma do paciente de inativar FVIII em plasma normal. Uma unidade Bethesda é definida como a quantidade de anticorpo que neutraliza 50% de atividade de FVIII no plasma, e títulos de 0,6 BU ou maiores sugerem a presença de anticorpo.

Os inibidores são geralmente classificados como baixo título se o nível for <5 BU e elevado título se ≥ 5 BU.

O nível de anticorpos inibidores do FVIII circulantes pode ser reduzido para 90%, 75%, 50%, 20%, 10%, 5% do nível de anticorpos que teria sido observado se o paciente não tivesse recebido tratamento.

O nível de anticorpos inibidores do FVIII circulantes pode ser reduzido para 5, 4, 3, 2, 1 ou 0,5 BU.

Os péptidos e composição da invenção podem aumentar a quantidade ou proporção de FVIII terapeuticamente administrado que está disponível para auxiliar a coagulação num paciente. Isto é devido à redução nos inibidores do FVIII que podem eficazmente evitar que uma proporção do FVIII exerça a sua função terapêutica. O péptido ou composição da invenção pode aumentar a quantidade de FVIII disponível por, por exemplo, 10%, 25%, 50%, 75% ou 100%.

Os péptidos e composição da invenção podem assim reduzir a quantidade de FVIII que necessita de ser administrada para auxiliar a coagulação num paciente.

Formulação

A composição pode ser preparada como um injetável, ou como solução líquida ou suspensão; pode ser também preparada forma sólida adequada para solução em, ou suspensão em, líquido antes de injeção. A preparação pode ser também emulsificada, ou os péptidos encapsulados em lipossomas. Os ingredientes ativos podem ser misturados com excipientes que sejam farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes adequados são, por exemplo, água, salino (por exemplo, tampão fosfato salino), dextrose, glicerol, etanol, ou similares e suas combinações.

Adicionalmente, se desejado, a composição pode conter quantidades mínimas de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsificantes e/ou agentes tamponantes de pH. Sais tamponantes incluem fosfato, citrato, acetato. Ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio podem ser usados para ajuste do pH. Para estabilização,

podem ser usados dissacarídeos tais como sacarose ou trehalose.

Se a composição compreender uma pluralidade de péptidos, a razão relativa dos péptidos pode ser aproximadamente igual. Alternativamente, as razões relativas de cada péptido podem ser alteradas, por exemplo, para focar a resposta tolerogénica num subconjunto particular de células T autorreativas ou se se descobrir que um péptido trabalha melhor do que os outros em tipos de HLA particulares.

Após formulação, a composição pode ser incorporada num recipiente estéril que é depois selado e armazenado a uma baixa temperatura, por exemplo 4°C, ou pode ser criodessecado.

Convenientemente, a composição é preparada como um pó liofilizado (criodessecado). A liofilização permite armazenamento a longo prazo numa forma estabilizada. Procedimentos de liofilização são bem conhecidos na técnica, ver por exemplo <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>.

Agentes de volume são comumente usados antes da criodessecação, tais como manitol, dextrano ou glicina.

A composição pode ser administrada de um modo convencional tal como pelas rotas oral, intravenosa (onde água solúvel), intramuscular, subcutânea, sublingual, intranasal, intradérmica ou com supositório ou implante (p.ex. usando moléculas de libertação lenta).

A composição pode ser vantajosamente administrada através de rotas intranasal, subcutânea ou intradérmica.

O péptido e composição da invenção podem ser usados para tratar um sujeito humano. O sujeito pode ter hemofilia A, em particular hemofilia A grave. O sujeito pode ser geneticamente deficiente em FVIII. O sujeito pode ter hemofilia adquirida. O sujeito pode ter anticorpos anti-FVIII inibidores.

O sujeito pode estar a ser submetido ou prestes a ser submetido a terapia de substituição de coagulante com FVIII.

O sujeito pode estar a ser submetido ou prestes a ser submetido a terapia génica com o gene de FVIII.

O sujeito pode ter um haplotipo HLA que está associado a uma predisposição para desenvolver aloanticorpos ou autoanticorpos anti-FVIII inibidores. O sujeito pode expressar HLA-DR2. Métodos para determinação do haplotipo HLA de um indivíduo são conhecidos na técnica.

Tipicamente, um médico determinará a dosagem real que será a mais adequada para um sujeito indivíduo e variará com a idade, peso e resposta do paciente particular.

Numa forma de realização particular, pode ser seguido um protocolo de "aumento da dose", onde uma pluralidade de doses é dada ao paciente em concentrações crescentes. Uma tal abordagem foi usada, por exemplo, para péptidos de fosfolipase A2 em aplicações imunoterapêuticas contra a alergia do veneno das abelhas (Müller *et al* (1998) *J. Allergy Clin Immunol.* 101:747-754 e Akdis *et al* (1998) *J. Clin. Invest.* 102:98-106).

Conjuntos

Convenientemente, se a composição compreender uma pluralidade de péptidos, eles podem ser administrados em conjunto, na forma de uma composição ou *cocktail* misto. No entanto, podem existir circunstâncias nas quais seja preferencial proporcionar os péptidos separadamente na forma de um conjunto, para administração simultânea, separada, sequencial ou combinada.

O conjunto pode também compreender meios de mistura e/ou administração (por exemplo, um vaporizador para administração intranasal; ou uma seringa e agulha para dosagem subcutânea/intradérmica). O conjunto pode também compreender instruções para uso.

A composição farmacêutica ou conjunto como descrito aqui pode ser usado para tratar e/ou prevenir uma doença.

Em particular, a composição/conjunto pode ser usado para tratar e/ou prevenir a hemofilia A ou hemofilia adquirida.

Hemofilia A

A hemofilia A (hemofilia clássica) é causada pela deficiência do Fator VIII.

A hemofilia A tem uma incidência estimada de 1 em 10.000 homens, enquanto se estime que a hemofilia B ocorra num em 40.000 homens. Aproximadamente 1 mulher em 5.000 é uma transportadora da hemofilia A, e 1 em 20000 é uma transportadora da hemofilia B.

A hemofilia é tipicamente dividida em três classes: grave, moderada e ligeira, com base no nível do fator de coagulação no sangue. Na hemofilia grave, existe menos do

que 1 por cento de fator de coagulação normal. O grau de gravidade tende a ser consistente de geração em geração.

Contrariamente à crença popular, cortes e feridas pequenos não constituem usualmente uma ameaça a hemofílicos. Ao invés, o perigo maior vem de hemorragia espontânea em articulações e músculos. É mais propenso que isto ocorra durante anos de rápido crescimento, tipicamente entre as idades de 5 e 15 anos.

A hemorragia espontânea repetida nas articulações pode causar artrite, e os músculos adjacentes tornam-se enfraquecidos. A pressão sobre nervos causada pela acumulação de sangue pode resultar em dor, entorpecimento, e incapacidade temporária de mover a área afetada.

A hemofilia A é usualmente diagnosticada com um teste ao sangue para determinar a eficácia da coagulação e para investigar se os níveis de fatores de coagulação são anormais.

O desenvolvimento de fatores de coagulação purificados nos 1970s, isolados de sangue doado, melhorou significativamente a perspectiva a longo prazo para os hemofílicos. Os hemofílicos ligeiros a moderados podem usar tratamento com FVIII numa base *ad hoc*, ao passo que os hemofílicos graves podem requerer tratamento regular, indefinido.

Previamente foi dado aos pacientes concentrados de fator VIII agrupados a partir de milhares de doações de plasma. Isto levou a problemas significativos de contaminação com patogénicos virais, particularmente o vírus da imunodeficiência humana e os vírus da hepatite. Técnicas de purificação de anticorpos monoclonais, inativação pelo

calor, tratamentos com detergentes virucidas têm tornado os concentrados derivados do plasma relativamente seguros.

A tecnologia de ADN recombinante tem proporcionado agora uma série de produtos sintéticos, tais como Recombinate™ e Kogenate™. O Kogenate™ é feito usando células do rim de *hamster* bebé expressando fator VIII humano. O fator resultante é altamente purificado, eliminando qualquer possibilidade de transmissão de vírus do plasma.

O péptido ou composição da presente invenção pode ser administrado antes da e/ou durante a terapia de substituição do fator VIII.

A hemofilia A é um alvo de doença ideal para terapia génica uma vez que i) é causada por uma mutação num único gene identificado, ii) um aumento ligeiro nos níveis do fator de coagulação *in vivo* pode converter a hemofilia grave em doença mais ligeira, e iii) as terapias de substituição correntes são consideradas subótimas. Igualmente existe uma ampla gama de segurança se existir uma "ultrapassagem" do nível desejado de atividade de coagulação.

Infelizmente, até à data, a promessa de terapia génica como uma cura para a hemofilia não foi cumprida, principalmente devido às dificuldades na descoberta de um sistema de distribuição de genes que seja suficientemente não imunogénico para permitir expressão a longo prazo do fator de coagulação.

Os péptidos da presente invenção seriam também adequados para tolerização de um sujeito antes da terapia génica com fator VIII e/ou gestão da formação de inibidores do fator VIII num pacientes após terapia génica.

Hemofilia adquirida

A hemofilia adquirida é caracterizada pela presença de inibidores de autoanticorpos contra FVIII em indivíduos com coagulação previamente normal. É uma condição rara, com uma incidência estimada de 1-3 por milhão de população por ano. A taxa de mortalidade associada a inibidores de autoanticorpos adquiridos aproxima-se de 25% *versus* o risco de morte substancialmente mais baixo naqueles com aloanticorpos.

Comparada com pacientes com inibidores de aloanticorpos, a hemofilia adquirida é caracterizada por: (1) um padrão de hemorragia mais grave; (2) incidência mais elevada na população mais velha; (3) ocorrência em conjunto com doenças autoimunes subjacentes identificáveis, malignidades linfoproliferativas ou de tumor sólido, gravidez, e uso de certos antibióticos tais como penicilina e sulfonamidas em aproximadamente 50% dos casos; e (4) atividade inibidora *in vitro* que segue um padrão farmacocinético do tipo II com neutralização incompleta da atividade do fator de coagulação alvo pelo autoanticorpo, resultando tipicamente em níveis de fator VIII residuais variando entre 2%-18% no plasma do paciente.

O péptido ou composição da presente invenção pode ser administrado a um paciente com hemofilia adquirida, ou a um paciente que se acredita estar em risco de desenvolver hemofilia adquirida devido a, por exemplo:

- i) tratamento iminente com, por exemplo, penicilina ou uma sulfonamida
- ii) progresso de um tumor ou outra malignidade
- iii) gravidez iminente ou inicial.

A invenção será agora adicionalmente descrita a título de Exemplos, que se destinam a servir para auxiliar um de perícia vulgar na técnica na realização da invenção e não se destinam de qualquer modo a limitar o âmbito da invenção.

Exemplos (Os exemplos 1 a 10 são somente para referência)

Exemplo 1: Seleção de péptidos do Fator VIII HLA-DR2

Uma série de péptidos 15mero do FDVIII foi comparada usando três algoritmos de ligação HLA-DR:

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

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

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

Foram selecionados péptidos que se previu que eram ligantes a HLA-DR2 por mais do que um dos programas e foram designadas sequências flanqueantes para os resíduos nucleares previstos (tabela 2).

TABELA 2

No. de Péptido	Primeiro AA do FVIII	Sequência em código de aminoácidos único	Também referido aqui como:
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIIARYIRLHPHY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYYSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFPLNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFERNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

Exemplo 2: Investigação da resposta de células restritas a HLA-DR2 de camundongos imunizados com fator VIII aos péptidos

Camundongos transgênicos HLA-DR2 foram imunizados com fator VIII humano em adjuvante. Células de linfonodos drenantes foram recolhidas e reestimuladas *in vitro* com diferentes concentrações dos 12 péptidos da tabela 2. Os resultados são mostrados na Figura 1.

As células restritas a HLA-DR2 dos camundongos imunizados com fator VIII responderam claramente fortemente ao péptido DNIMV (1º aminoácido 1788). Existiram também respostas aos péptidos PRCLT (545) e PPIIA (2161).

Exemplo 3: Investigação da resposta de células T de camundongos HLA-DR2 aos péptidos

Camundongos HLA-DR2 foram primeiramente imunizados com fator VIII em adjuvante. Células do baço de camundongos imunes foram reestimuladas *in vitro* com fator VIII e os linfoblastos resultantes foram fundidos com o timoma BW5147 usando polietileno glicol.

Hibridomas de células T foram selecionados em meio HAT e os hibridomas clonados e testados quanto à sua resposta ao fator VIII. Os hibridomas foram depois rastreados quanto à sua resposta aos 12 péptidos previstos. Dos 27 hibridomas rastreados, 11 responderam a DNIMV, 3 a PRCLT e 3 a PPIIA, embora a resposta a PPIIA tivesse sido mais fraca e menos específica. A resposta dos dois hibridomas específicos para DNIMV e PRCLT é mostrada na Figura 2.

Exemplo 4 - Investigação da resposta de células de linfonodos de camundongos FVIII-DR2+ aos péptidos

Camundongos transgênicos HLA-DR2 foram cruzados com camundongos deficientes em fator VIII para criar um modelo de hemofilia expressando a molécula de classe II do MHC HLA humana.

Estes animais FVIII-DR2+ foram imunizados com fator VIII em adjuvante. Linfonodos drenantes foram isolados e testados quanto à sua resposta ao painel de péptidos. Como mostrado na Figura 3, estas células responderam bem a PRCLT e DNIMV. Existiu uma fraca resposta a GTLMV e resposta significativa a RYLRI.

Exemplo 5 - Investigação da resposta de células T de camundongos HLA-DR2 aos péptidos

Camundongos deficientes em fator VIII expressando HLA-DR2 foram imunizados com fator VIII em adjuvante. As células do baço de camundongos imunizados foram reestimuladas *in vitro* com fator VIII e os linfoblastos resultantes foram fundidos com BW5147, como descrito acima. Os hibridomas de células T foram rastreados quanto à sua resposta aos 12 péptidos previstos. Mais uma vez, a maioria dos hibridomas respondeu aos péptidos DNIMV e PRCLT. Dos 19 hibridomas específicos para o fator VIII, 10 responderam a DNIMV, 6 a PRCLT, 1 a PPIIA, 1 a SLYIS e 1 a DTLII. Exemplos de respostas por estes hibridomas são mostrados na Figura 4.

Com base nestas experiências, é evidente que dois péptidos DNIMV (primeiro aminoácido número 1788) e PRCLT (primeiro aminoácido 545) constituem os epítomos de células T imunodominantes na resposta de células T restritas a HLA-DR2 ao fator VIII humano.

Exemplo 6 - DNIMV e PRCLT comportam-se como apítomos

De modo a ser um apítomo, um péptido tem de ser capaz de se ligar a uma molécula de classe I ou II do MHC sem processamento de antígeno adicional (i.e. encurtamento) e ser apresentado a uma célula T. No presente caso, foi investigada a capacidade dos péptidos em serem apresentados por APC fixas.

Células Mgar foram ou frescas ou fixas com paraformaldeído a 1%. Os clones foram testados quanto à especificidade antigénica por cultura de 100 μ L de células do hibridoma com 5×10^4 células Mgar na presença e ausência de rhFVIII a 20 μ g/mL ou epítomos de péptido durante a noite. Os sobrenadantes foram depois recolhidos e avaliados quanto à

produção de IL-2 por ELISA. O facto de que rhFVIII tem de ser apresentado por células Mgar vivas demonstra que a proteína intacta requer processamento de antigénio para ser apresentada. Os péptidos DNIMV e PRCLT, por outro lado, são apresentados por células Mgar vivas e fixas indicando que estes péptidos funcionam como apítomos (Figura 5).

Exemplo 7 - Determinação da gama de epítomos de péptido capazes de funcionar como apítomos

A gama de epítomos de péptido capazes de funcionar como apítomos nas sequências rodeando DNIMV, PRCLT e os outros péptidos foi identificada por preparação de painéis de péptidos sobrepostos (mostrado nas páginas 41-43) e rastreio destes usando os hibridomas de células T usando o mesmo método como no Exemplo 5 (Figura 7).

Exemplo 8 - DNIMV e PRCLT induzem tolerância a proteína do fator VIII inteira

Camundongos transgénicos HLA-DR2 foram tratados com qualquer um dos dois péptidos solúveis, ou PBS como um controlo, antes de imunização com fator VIII em adjuvante. Linfonodos drenantes foram isolados e as células reestimuladas *in vitro* com proteína do fator VIII de modo a avaliar o estado imune dos camundongos. Como mostrado na Figura 6, o tratamento dos camundongos com DNIMV ou PRCLT levou a uma supressão substancial da resposta imune ao fator VIII.

Exemplo 9 - Investigação de se DNIMV e PRCLT são capazes de induzir tolerância no camundongo nocaute no fator VIII

Sabia-se do Exemplo 8 que estes dois péptidos são capazes de prevenir a resposta imune ao fator VIII em camundongos expressando fator VIII endógeno. A experiência foi repetida com animais FVIII-DR2+ para determinar se estes péptidos

também preveniam a resposta imune ao fator VIII em camundongos deficientes em fator VIII.

Exemplo 10 - Investigação de se DNIMV e PRCLT em combinação são capazes de induzir tolerância no camundongo nocaute no fator VIII

Os péptidos que se mostrou que reduziam individualmente a resposta imune ao fator VIII no camundongo deficiente em fator VIII no Exemplo 9 foram combinados. Como mostrado na Figura 8, o tratamento de camundongos com DNIMV e PRCLT levou a uma supressão substancial da resposta imune ao fator VIII, como mostrado pela diminuição na produção de IFN-gama. IFN-gama é a principal linfocina de mudança de classes requerida para neutralização de anticorpos no camundongo. O efeito demonstrado foi maior do que aquele observado usando qualquer um dos péptidos sozinhos.

Exemplo 11: A indução de tolerância usando um péptido modificado

O péptido DNIMV é parcialmente, mas não completamente, solúvel. De modo a melhorar a solubilidade do péptido, foi desenhada uma versão modificada com a seguinte sequência: EDNIMVTFRNQASR.

Esta é prolongada no terminal N para se adicionar um resíduo hidrofílico carregado. É também truncada no terminal C para remover os resíduos prolina e tirosina. Além do mais, por colocação de aminoácidos positivamente e negativamente carregados em qualquer uma das extremidades do péptido, é criado um dipolo elétrico que se diz que aumenta a solubilidade.

O péptido modificado é mais solúvel do que DNIMV e suficientemente solúvel para permitir distribuição

intranasal do péptido. De modo a avaliar a indução de tolerância usando este epítipo de péptido, camundongos deficientes em FVIII foram tomados e semitratados com o péptido EDNIMV modificado (referidos como "tolerizados" na Figura 9). Os camundongos foram depois imunizados com DNIMV em CFA e, 10 dias mais tarde, os linfonodos drenantes foram recolhidos e estimulados *in vitro* com DNIMV ou EDNIMV. A Figura 9 mostra os resultados para respostas de camundongos ingênuos ou tolerizados estimulados com DNIMV ou EDNIMV *in vitro*.

Os resultados demonstram que EDNIMV é capaz de se recordar de uma resposta imune de camundongos imunizados com DNIMV. Além do mais, demonstram muito claramente que camundongos tolerizados com EDNIMV falham em montar uma resposta imune a DNIMV *in vivo* como revelado pela falta de resposta a DNIMV ou EDNIMV *in vitro* após imunização com DNIMV em CFA.

Exemplo 12: EDNIMV induz tolerância a proteína do fator VIII inteira

A experiência descrita no Exemplo 8 é repetida para o péptido modificado EDNIMV para demonstrar que EDNIMV é capaz de suprimir a resposta imune à proteína do fator VIII inteira.

Métodos

(i) Respostas de recordação para camundongos DR2+ imunizados com rhFVIII

Camundongos nulos em classe II do MHC de murino HLA-DR2+ foram imunizados com 40 µg de rhFVIII emulsificado em Adjuvante de Freund Completo suplementado com 400 µg de *M.tuberculosis* H37Ra morta pelo calor, subcutaneamente na base da cauda. 10 dias depois, os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes removidos.

Suspensões de célula única foram preparadas e os linfócitos incubados a $4-5 \times 10^5$ células por poço em placas com fundo redondo com 96 poços durante 72 horas com as concentrações indicadas de péptido ou antigénios de controlo antes de pulsagem com timidina tritiada a $0,5 \mu\text{Ci/poço}$ durante 16 horas adicionais. As placas foram depois congeladas antes de as células serem recolhidas em esteiras de filtro de vidro e a incorporação radioativa medida usando um β -contador de cintilação líquida.

(ii) Especificidade de péptido FVIII de hibridomas de células T gerados a partir de camundongos DR2+

Camundongos nulos em classe II do MHC de murino HLA-DR2+ foram imunizados como acima. Ao dia 10, os linfonodos drenantes foram removidos e os linfócitos cultivados a $2,5 \times 10^6$ células/mL, 1 mL/poço em placas com 24 poços na presença de 20 rhFVIII a $\mu\text{g/mL}$ durante 3 dias. Após esta estimulação, os linfócitos foram recuperados, lavados e fundidos com células parceiras de fusão $\text{TCR}\alpha\beta^-$ BW a uma razão de 4 células BW em relação a 1 linfócito, usando polietileno glicol como descrito por Nelson *et al* (1980) *PNAS* 77(5):2866. As células fundidas foram cuidadosamente lavadas e depois plaqueadas em placas com fundo redondo com 96 poços durante 2 dias antes da adição de meio HAT para selecionar hibridomas das células T. As células foram monitorizadas quanto ao crescimento e, aproximadamente 10 dias após as fusões terem sido realizadas, clones individuais foram selecionados e transferidos para placas com 24 poços em meio HAT. Os clones foram mantidos em meio HAT durante pelo menos 2 semanas antes de serem desmamados em meio HT e depois meio completo. Os clones foram testados quanto à especificidade antigénica por cultivo de 100 μL de células de hibridoma com 5×10^4 células Mgar na presença e ausência de rhFVIII a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante a noite. Os

sobrenadantes foram depois recolhidos e avaliados quanto à produção de IL-2 por ELISA, com clones produzindo IL-2 em resposta a rhFVIII sendo considerados positivos quanto à especificidade de FVIII. Para investigar o repertório de péptidos FVIII previstos, clones específicos para FVIII foram testados novamente quanto à produção de IL-2, após incubação durante a noite com 20 µg/mL de cada um dos 12 péptidos.

(iii) Respostas de recordação para camundongos FVIII-/- imunizados com rhFVIII

Foi seguido o mesmo método como para (i), exceto que os camundongos eram deficientes em FVIII, HLA-DR2+ e nulos em classe II do MHC de murino.

(iv) Especificidade de péptido FVIII de hibridomas de células T gerados a partir de camundongos FVIII-/-

Foi seguido o mesmo método como para (ii), exceto que os camundongos eram deficientes em FVIII e HLA-DR2+.

(v) Tolerização de respostas específicas para FVIII em camundongos DR2+ por pré-tratamento com péptidos FVIII imunodominantes

Camundongos nulos em classe II do MHC de murino HLA-DR2+ foram tratados 3 vezes com 100 µg de DNIMV, PRCLT ou PPIIA dissolvidos em PBS, ou o volume equivalente de PBS sozinho. Os péptidos foram administrados intraperitonealmente, com 3-4 dias entre cada dose. Após a administração final, os camundongos foram imunizados com rhFVIII emulsificado em adjuvante de Freund completo como para (i). 10 dias mais tarde, os linfonodos drenantes foram recuperados e os linfócitos subsequentemente cultivados *in vitro* com rhFVIII, ou cada um dos péptidos tolerizantes bem como

antigénios de controlo, durante 72 horas antes da adição de timidina tritiada como para (i).

(vi) Tolerização de respostas específicas para FVIII em camundongos DR2+ por pré-tratamento com uma combinação de péptidos FVIII imunodominantes

Camundongos nulos em classe II do MHC de murino HLA-DR2+ foram tratados 3 vezes com 100 µg de DNIMV, PRCLT ou uma combinação de ambos DNIMV e PRCLT dissolvidos em PBS, ou o volume equivalente de PBS sozinho. Os péptidos foram administrados intraperitonealmente, ao longo de 8 dias. Após a administração final, os camundongos foram imunizados com rhFVIII emulsificado em adjuvante de Freund completo como para (i). 10 dias mais tarde, os linfonodos drenantes foram recuperados e os linfócitos subsequentemente reestimulados *in vitro* com rhFVIII. Os sobrenadantes foram depois recolhidos e a IFN-gama foi medida.

SEQ ID No.1

1 mqieltctff lclrlcfssa frryylgave lswdymqsdl gelpvdarfp prvpksfpfn
61 tsvvykktlf veftdhlfnl akprppwmgf lgptiqaevy dtvvtlknm ashpsvlsh
121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshyvvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkswhe tknslmqdrd
241 aasarawpkm htvnngyvnrs lpgligchrk svywhvigmg tpevhslf eghtflvrnh
301 rqasleispi fltaqtlm dlqqlfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlrmkne
361 eaedydddt dsemdvvrfd ddnspsqi rsvakkhpk wvhyaeeee dwdyaplva
421 pddrsyksqy lnnpgqrgr kykkvrfmay tdefktrea iqhesgilp llygevgdtl
481 liifknqasr pyniypgdt dvrplysrrl pkgvkhkdf pilpgeify kwtvtvedgp
541 tkdprcltr yyssfvnmer dlasglglpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilsvfde
601 nrswylteni qrlpnpagv qldepefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
661 igaqtdflsv ffsgytkhk mvyedtlif pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrng
721 mtalkvssc dkntgdyed syedisayil sknaieprs fsqsrhpst rqqfnatti
781 pendiektdp wfahrtpmpk iqnvssd!! mlrqsptph glslsdlqea kyetfsddps
841 pgaidssnsl semthfrpql hhsdgmvtfp esglqlrlne klgtaatel kkldfkvsst
901 snlistips dnlaagdnt sslgppsmvp hydsqldtl fgkksplte sggsplsee
961 nndskiles lmnsqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
1021 ktsnnsatnr kthidgpsl ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatair
1081 nhmsnktss knmemvqkk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nlfeknkvv vgkgeftkdv glkemvfpss mflitldn
1201 lhenhthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknifls trqnvegsyd
1261 gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtqiveky acttrispnt
1321 sqqnfvtrs kralkqrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrsplpia kvssfpsirp iyltrvlqad nsshlpaasy
1441 rkkdsgvqes shfiqgakkn nlsailtie mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp
1501 kpdlpktsgk vellpkvhiy qkdlftets ngspghdlv egslqgteg aikwneanrp
1561 gkvplirvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnpv vlkrhqreit rttlqsdqee
1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktthyfia averlwdygm sssphvlmr
1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllp yiraevedni mvtrfnqasr
1801 pysfsslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
1861 dlekdvhsgl igpllvchn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmernra
1921 pcniqmedpt fkenyrthai ngymdtlpg lvmaqddrir wyllsmgsne nihsihfsg
1981 vftvrkkey kmalynlypg vftvmlps kagiwrvecl ighlhagms tflvysnkc
2041 qtpgmasgh irdfqitasg qygqwapkia rhygsina wstkepfswi kvdlapmii
2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnfn
2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewiq vdfqtkmktv gvtqgvksl ltsmyvkefl
2281 isssqdghqw tiffqngkvk vfqgnqdsft pvnslidppl ltrylrhpq swvhqialrm
2341 evlgceaql y

Painéis de péptidos sobrepostos preparados no Exemplo 7

Conjunto sobreposto para DTLIIIFKNQASRPY

1.	473-488	YGEVGD TLLIIFKNQ
2.	474-489	GEVGD TLLIIFKNQA
3.	475-490	EVGD TLLIIFKNQAS
4.	476-491	VGD TLLIIFKNQASR
5.	477-492	GD TLLIIFKNQASRP
6.	478-493	DTLLIIFKNQASRPY
7.	479-494	TLLIIFKNQASRPYN
8.	480-495	LLIIFKNQASRPYNI
9.	481-496	LIIIFKNQASRPYNIY
10.	482-497	IIFKNQASRPYNIYP
11.	483-498	IFKNQASRPYNIYPH

Conjunto sobreposto para PRCLTRYSSSFVNME

1.	540-554	PTKSDPRCLTRYSS
2.	541-555	TKSDPRCLTRYSSF
3.	542-556	KSDPRCLTRYSSFV
4.	543-557	SDPRCLTRYSSFVN
5.	544-558	DPRCLTRYSSSFVNM
6.	545-559	PRCLTRYSSSFVNME
7.	546-560	RCLTRYSSSFVNMER
8.	547-561	CLTRYSSSFVNMERD
9.	548-562	LTRYSSSFVNMERDL
10.	549-563	TRYSSSFVNMERDLA
11.	550-564	RYSSSFVNMERDLAS

Conjunto sobreposto para 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	TFRNQASRPYSFYSS

Conjunto sobreposto para SLYISQFIIMYSLDG

1.	2109-2123	RQKFSSLYISQFIIM
2.	2110-2124	QKFSSLYISQFIIMY
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

Conjunto sobreposto para PPIIARYIRLHPHXY

1. 2156-2170	HNIFNPPIIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPIIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPIIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIIARYIRLHPT
5. 2160-2174	NPPPIIARYIRLHPH
6. 2161-2175	PPIIARYIRLHPHXY
7. 2162-2176	PIIARYIRLHPHXYH
8. 2163-2177	IIARYIRLHPHXYSI
9. 2164-2178	IARYIRLHPHXYSIR
10. 2165-2179	ARYIRLHPHXYSIRS
11. 2166-2180	RYIRLHPHXYSIRST

Conjunto sobreposto para RYLRIHPQSWVHQIA

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

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Apitope Technology (Bristol) Limited

<120> PÉPTIDOS

<130> P036475EPA

<150> GB 0908515.0

<151> 2009-18-05

<160> 83

<170> versão PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765
 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860
 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880
 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895
 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925
 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro
 1175 1180 1185

Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu
1190						1195					1200			
Asn	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu
1205						1210					1215			
Lys	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile
1220						1225					1230			
His	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu
1235						1240					1245			
Leu	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr
1250						1255					1260			
Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn
1265						1270					1275			
Arg	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu
1280						1285					1290			
Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu
1295						1300					1305			
Lys	Tyr	Ala	Cys	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln
1310						1315					1320			
Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg
1325						1330					1335			
Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp
1340						1345					1350			
Asp	Thr	Ser	Thr	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro
1355						1360					1365			
Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala
1370						1375					1380			
Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser
1385						1390					1395			
Ile	Pro	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 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			
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> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 8

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

<210> 9

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 9

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

<210> 10

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 13

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

<210> 14

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
1 5

<210> 15

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 15

Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
1 5

<210> 16

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 16

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1 5

<210> 17

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 17

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 18

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 18

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
1 5

<210> 19

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 19

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 20

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1 5

<210> 21

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_VAR

< 222> (1) .. (1)

< 223> Xaa é um resíduo de aminoácido hidrofílico carregado

<400> 21

Xaa	Asp	Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser
1				5					10			

<210> 22

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_VAR

< 222> (1)..(1)

< 223> Xaa é um aminoácido carregado com polaridade reversa em relação a Xaa na posição 14

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_VAR

< 222> (14).. (14)

< 223> Xaa é um aminoácido carregado com polaridade reversa em relação a Xaa na posição 1

<400> 22

Xaa Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Xaa
1 5 10

<210> 23

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 24

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

<210> 25

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 31

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

<210> 32

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 33

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

<210> 34

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 34

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

<210> 35

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 38

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

<210> 39

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 39

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

<210> 40

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 40

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

<210> 41

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 41

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

<210> 42

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 42

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

<210> 43

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 43

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

<210> 44

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 44

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

<210> 45

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 45

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

<210> 46

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 46

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

<210> 47

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 47

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

<210> 48

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 48

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

<210> 49

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 49

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

<210> 50

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 50

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

<210> 51

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 51

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

<210> 52

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 52

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

<210> 53

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 53

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

<210> 54

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 54

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

<210> 55

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 55

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

<210> 56

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 56

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

<210> 57

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 57

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

<210> 58

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 58

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

<210> 59

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 60

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

<210> 61

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 61

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

<210> 62

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 62

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

<210> 63

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 63

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

<210> 64

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 64

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

<210> 65

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 65

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

<210> 66

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 66

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro

1 5 10 15

<210> 67

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 67

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

<210> 68

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 68

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

<210> 69

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 69

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

<210> 70

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 70

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

<210> 71

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 71

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

<210> 72

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 72

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

<210> 73

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 73

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

<210> 74

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 74

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

<210> 75

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 75

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

<210> 76

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 76

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

<210> 77

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 77

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

<210> 78

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 78

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

<210> 79

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 79

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

<210> 80

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 80

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

<210> 81

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 81

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

<210> 82

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 82

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

<210> 83

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 83

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

Lisboa, 27 de Novembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um péptido que consiste na sequência EDNIMVTFRNQASR.
2. Uma composição compreendendo uma pluralidade de péptidos, incluindo um péptido de acordo com a reivindicação 1.
3. Um péptido de acordo com a reivindicação 1, ou uma composição de acordo com a reivindicação 2, para uso no tratamento de hemofilia num sujeito.
4. Um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou composição de acordo com a reivindicação 2 para uso no tratamento de hemofilia num sujeito de acordo com a reivindicação 3, em que o sujeito
 - (a) tem hemofilia A, e está a ser submetido, ou está prestes a ser submetido, a terapia de substituição do fator VIII; ou
 - (b) tem, ou está em risco de contrair, hemofilia adquirida.
5. Um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou composição de acordo com a reivindicação 2 para uso no tratamento de hemofilia num sujeito de acordo com a reivindicação 3, em que o sujeito é HLA-DR2.

Lisboa, 27 de Novembro de 2014

FIG. 1

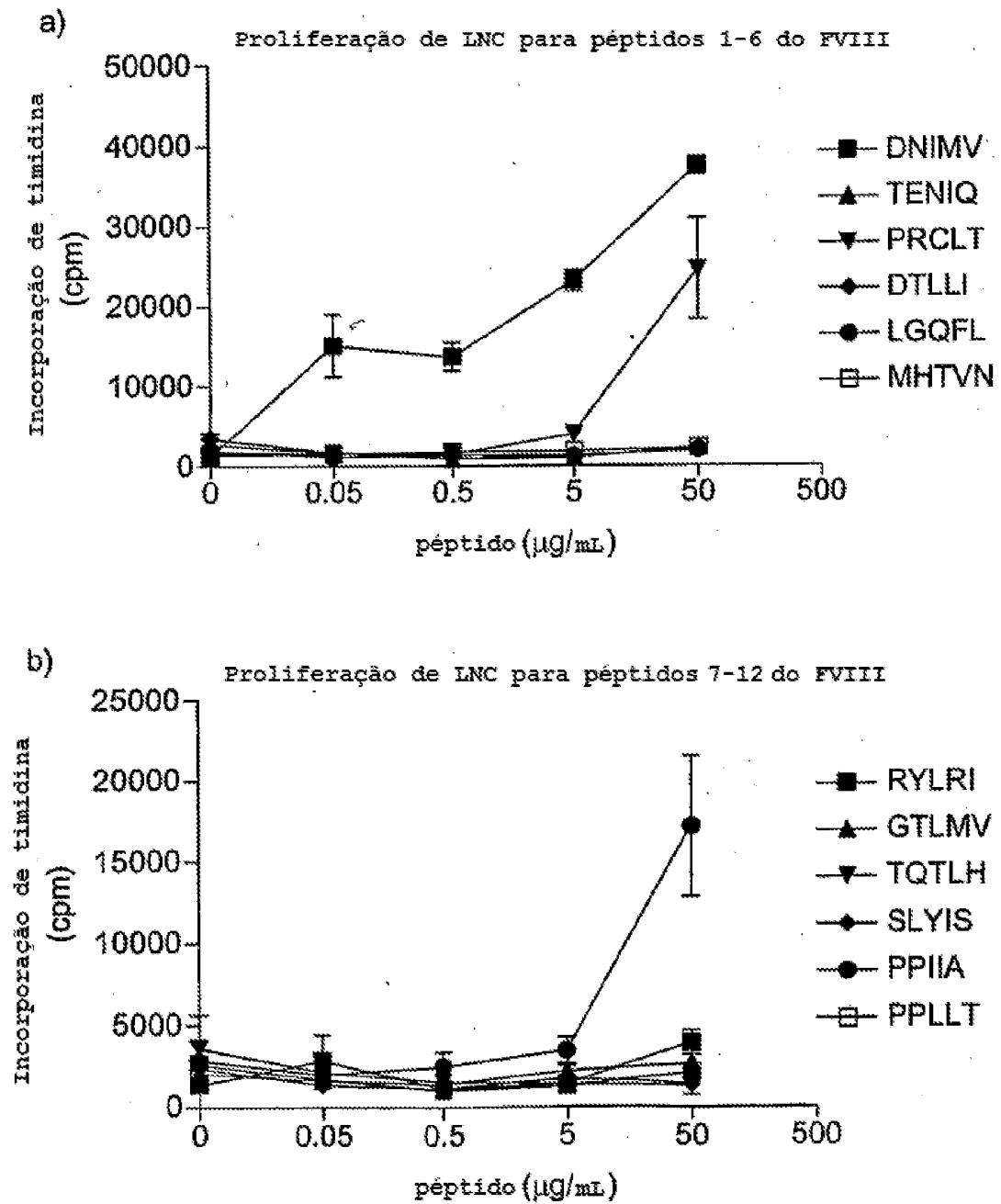


FIG. 1 CONT'D

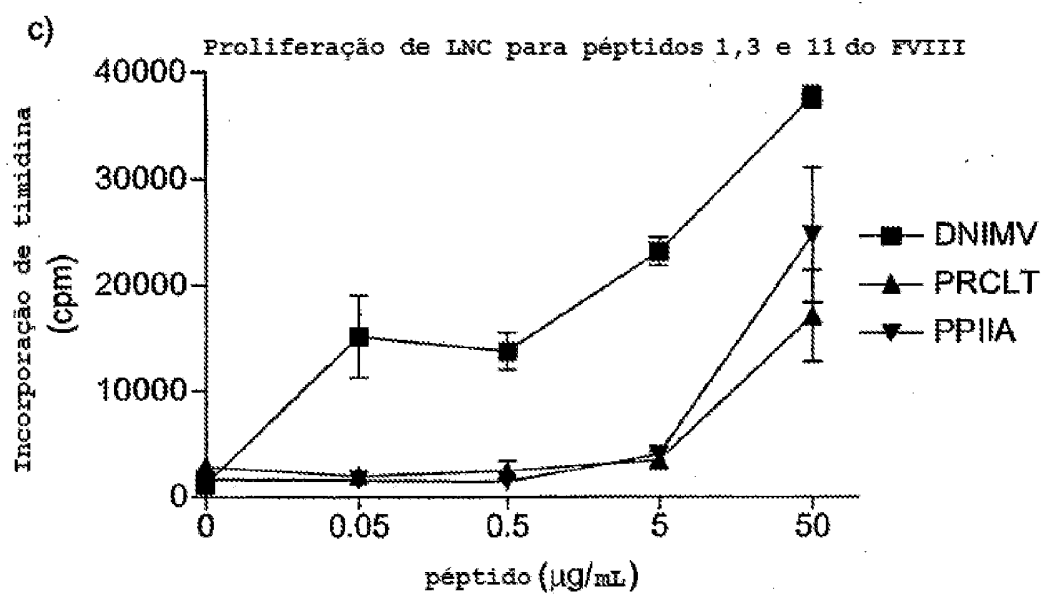


FIG. 2

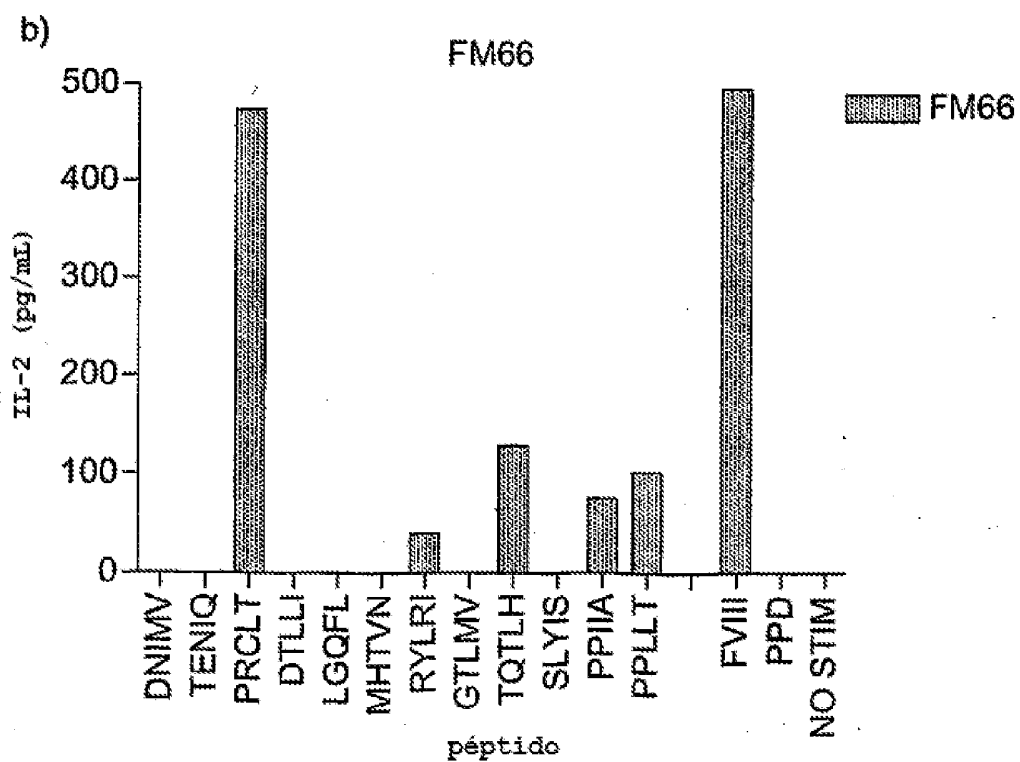
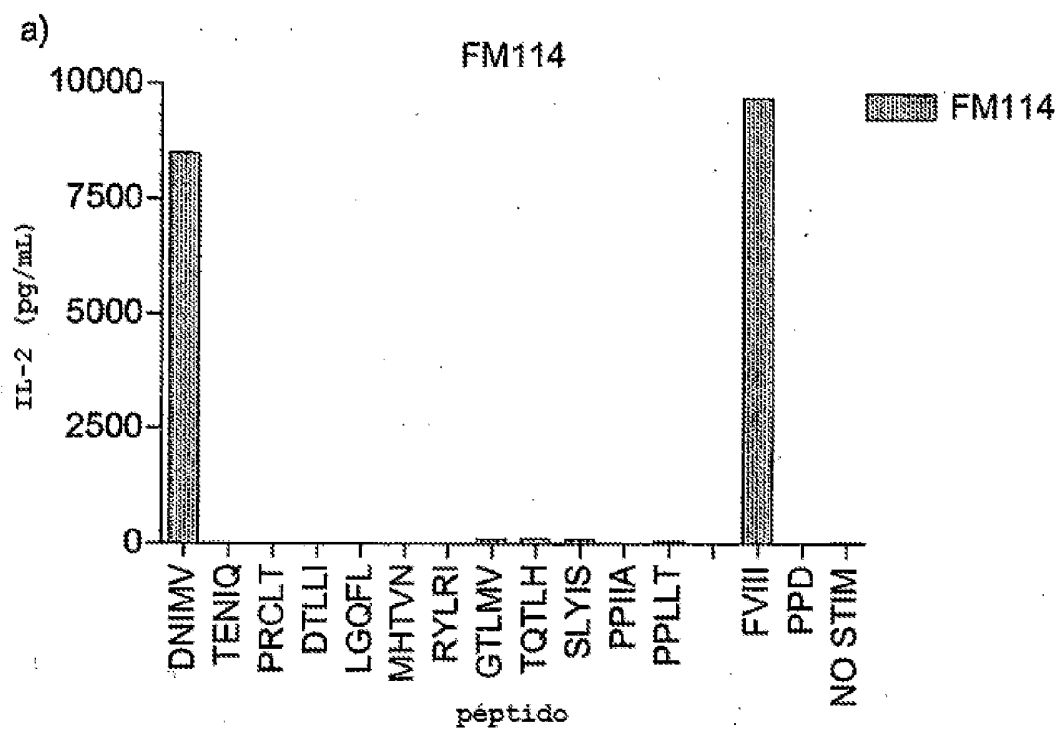


FIG. 3

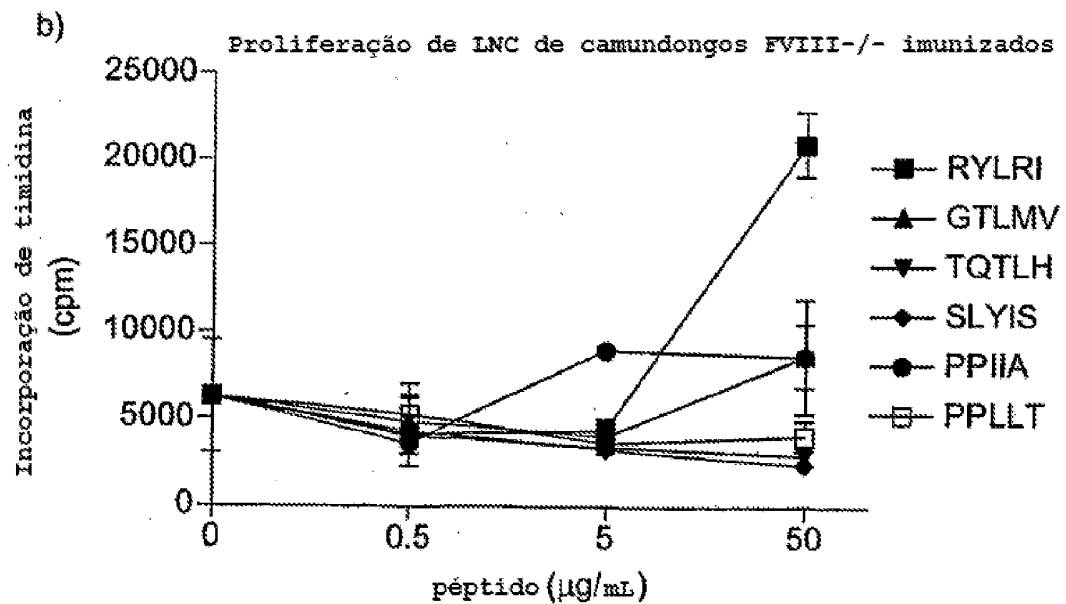
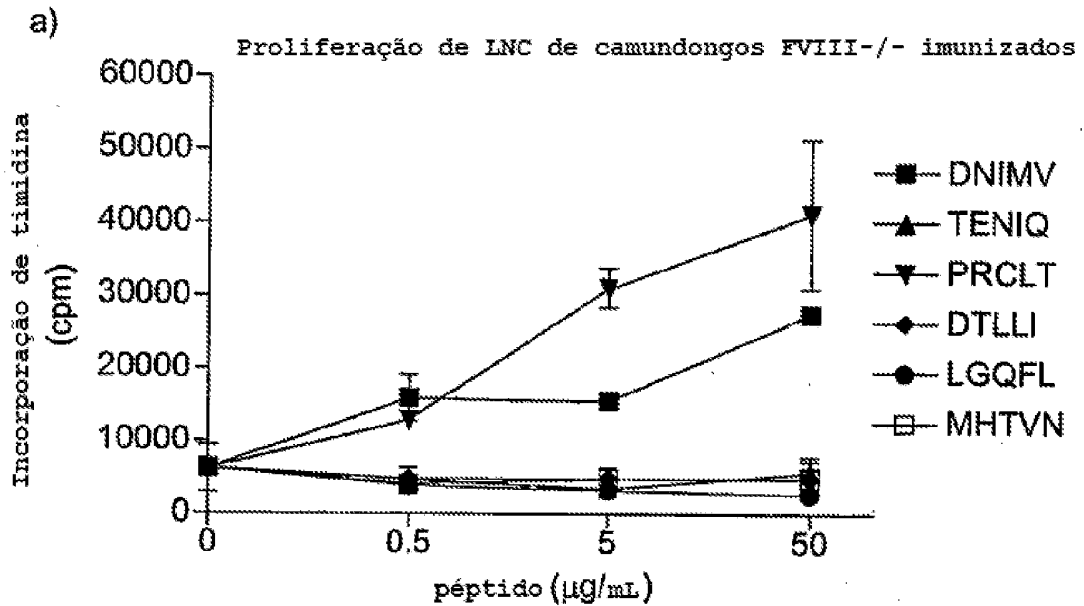


FIG. 3 CONT'D

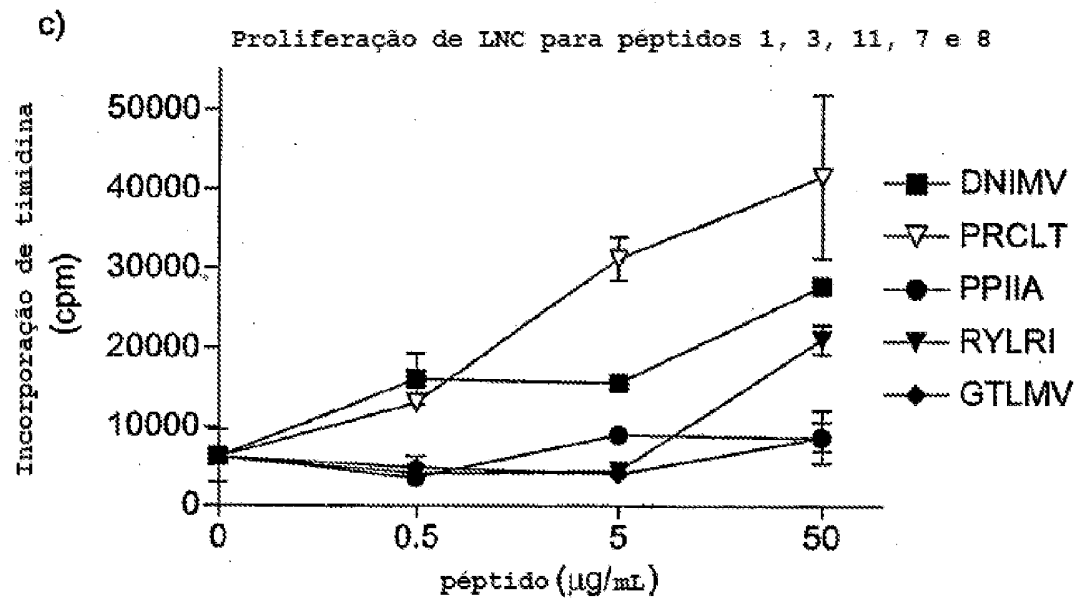


FIG. 4

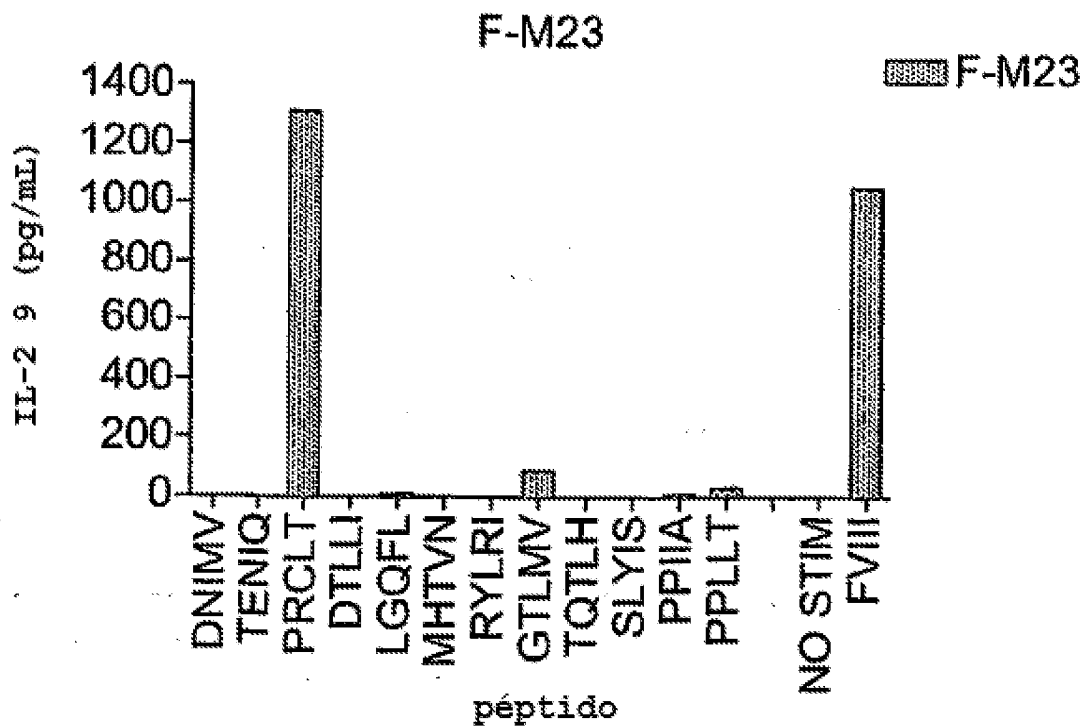
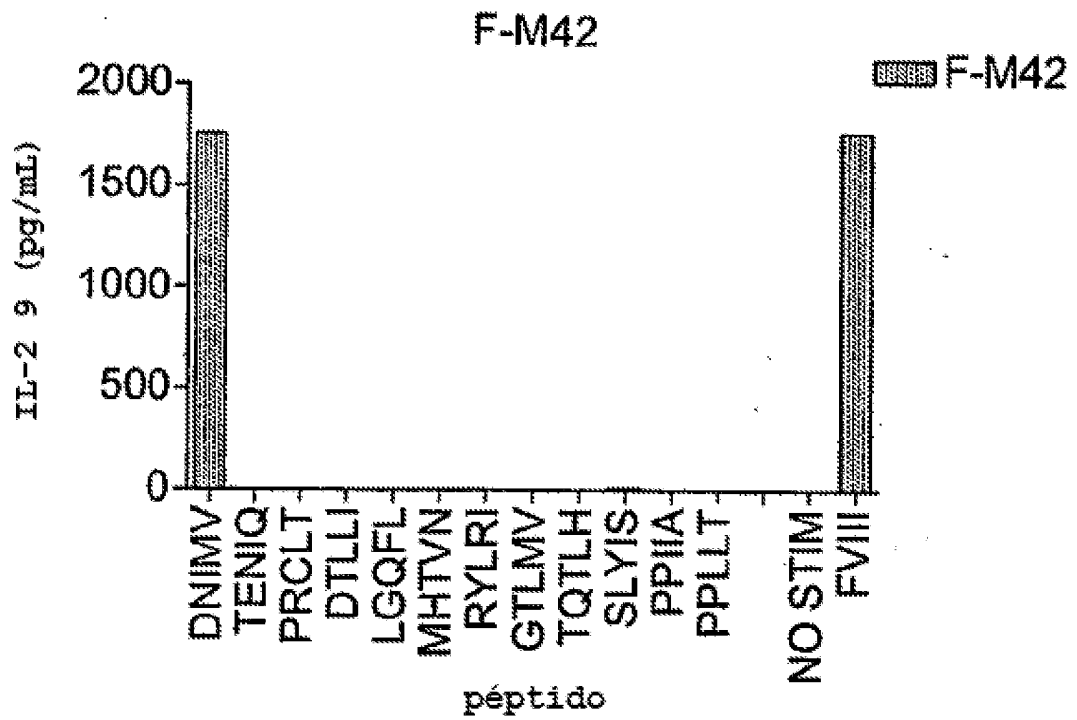


FIG. 4 CONT'D

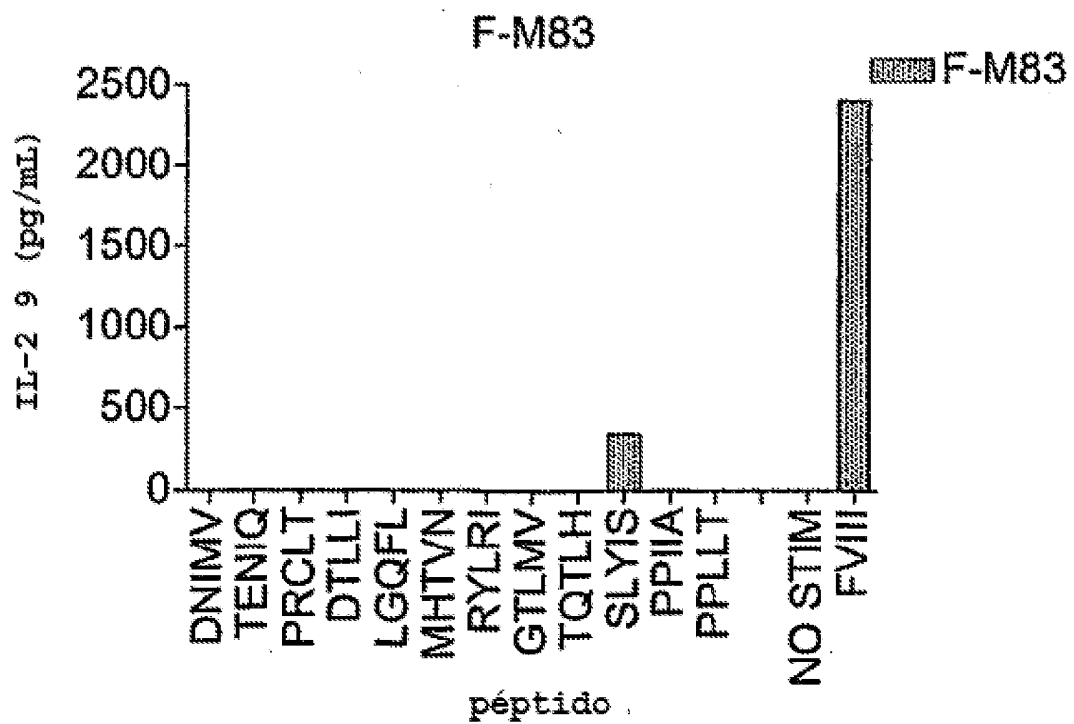
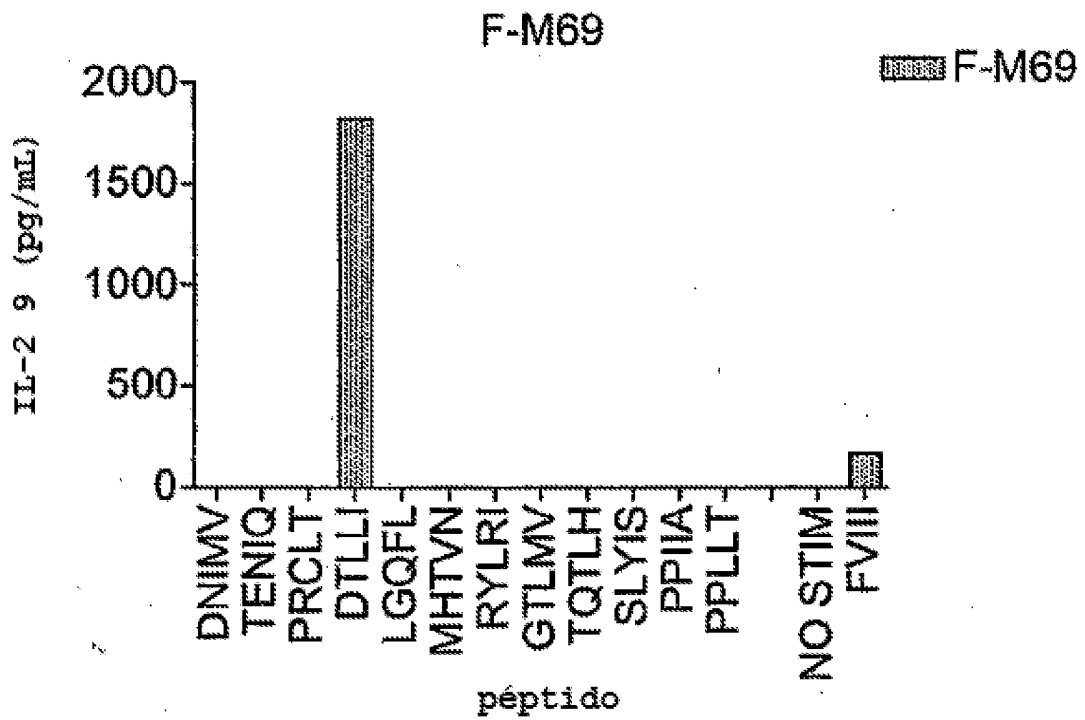


FIG. 5

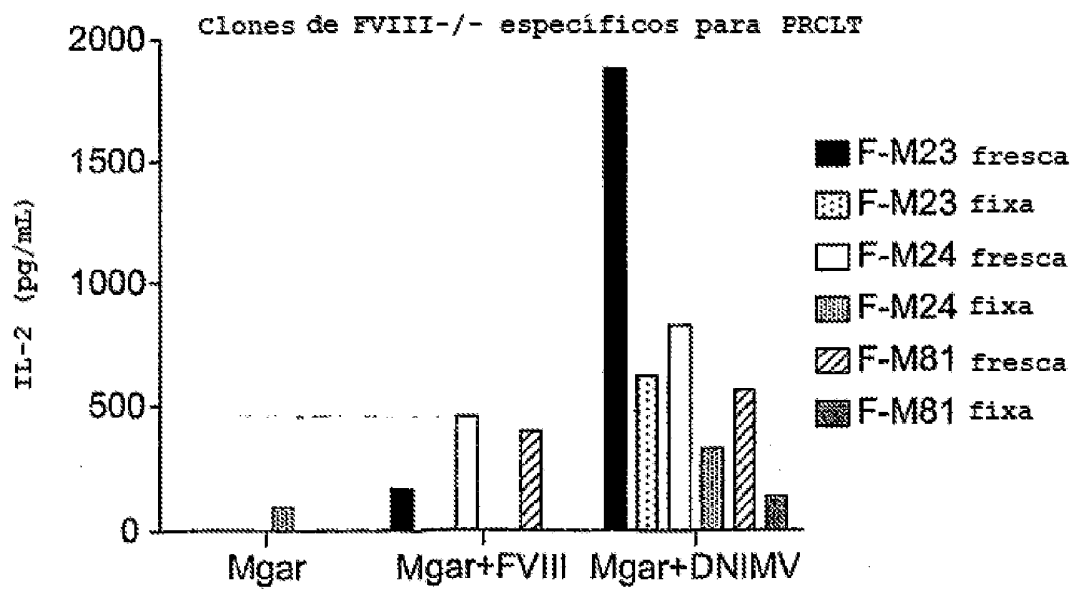
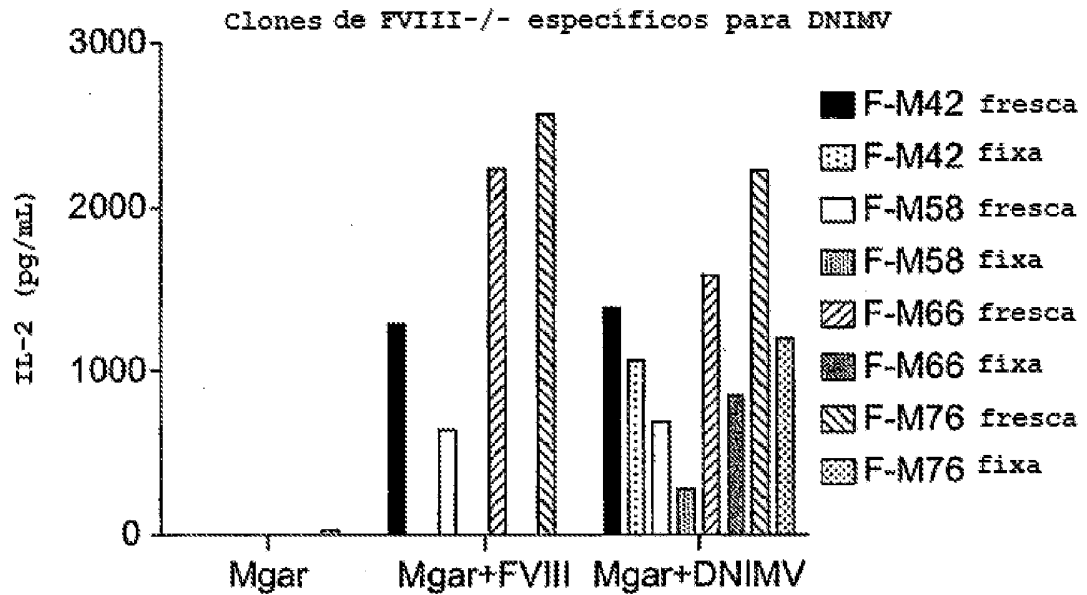


FIG. 6

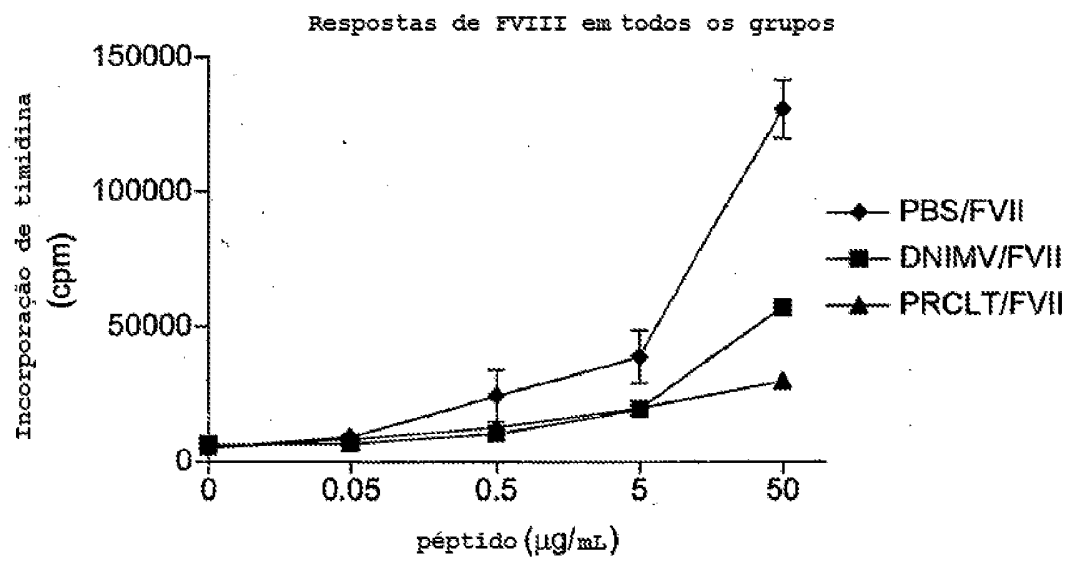


FIG. 7a

Produção de IL-2 média para péptidos DNIMV sobrepostos (8 clones)

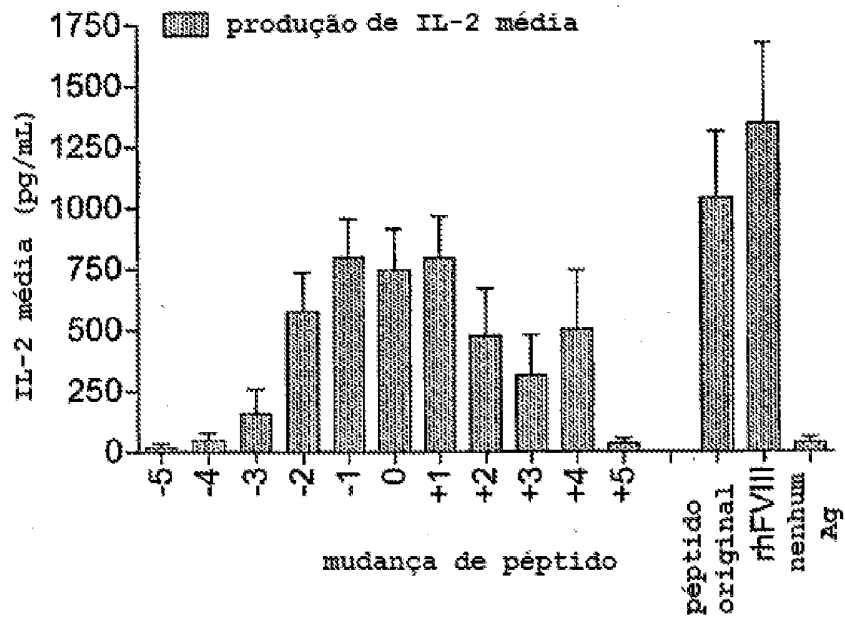


FIG. 7b

Produção de IL-2 média para péptidos PRCLT sobrepostos (4 clones)

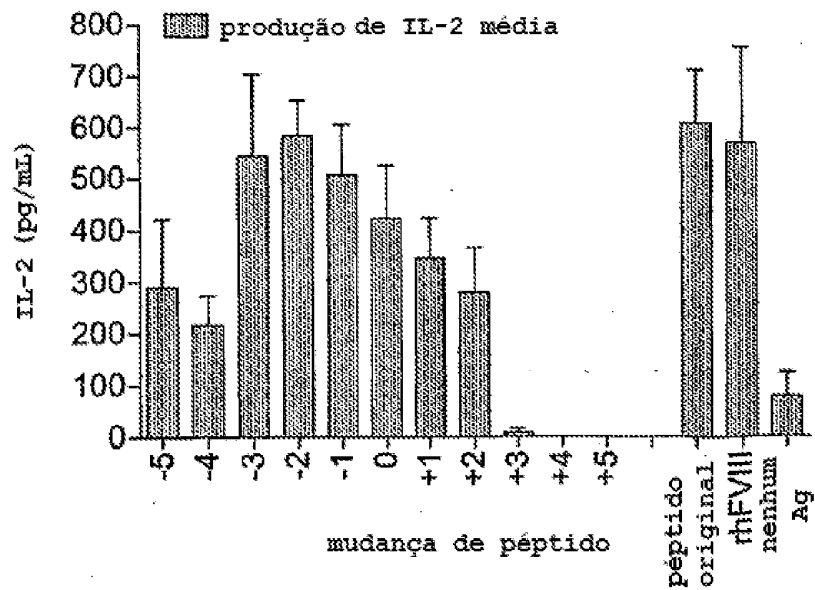
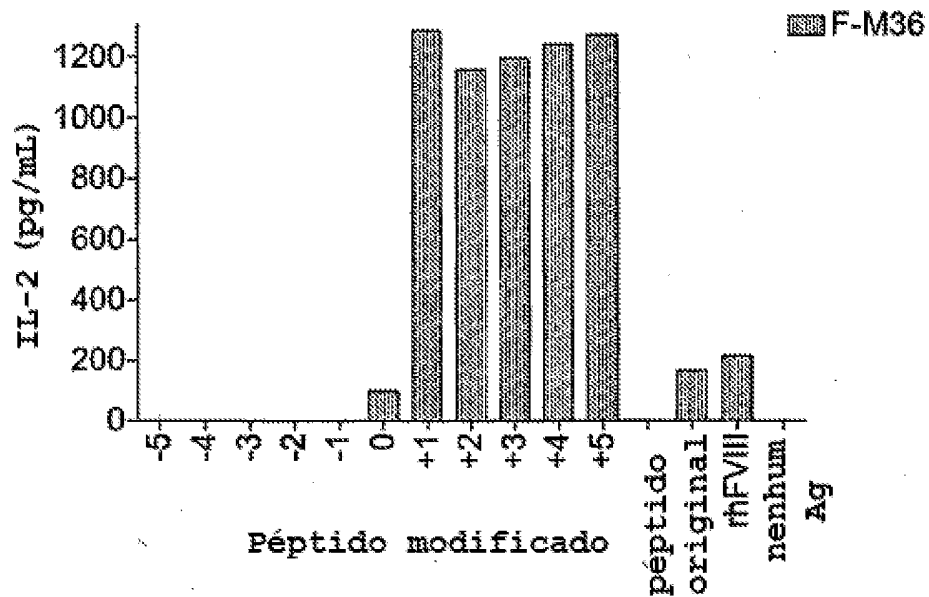


FIG. 7c

Produção de IL-2 média para peptídeos sobrepostos PPIIA, DTLII, SLYIS e RYLRI

Rastreo de peptido sobreposto PPIIA: F-M36



Rastreo de peptido sobreposto PPIIA: FM6 (clone DR2)

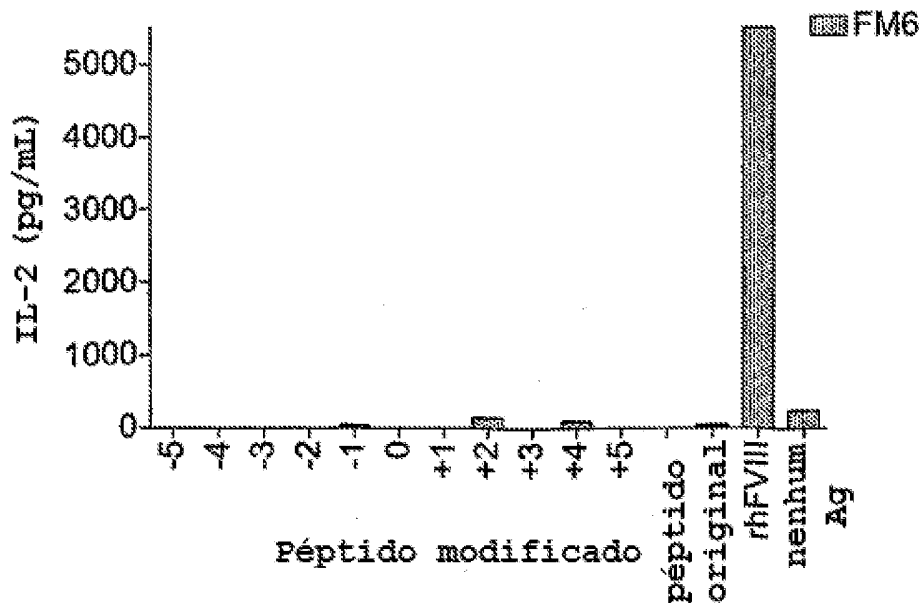
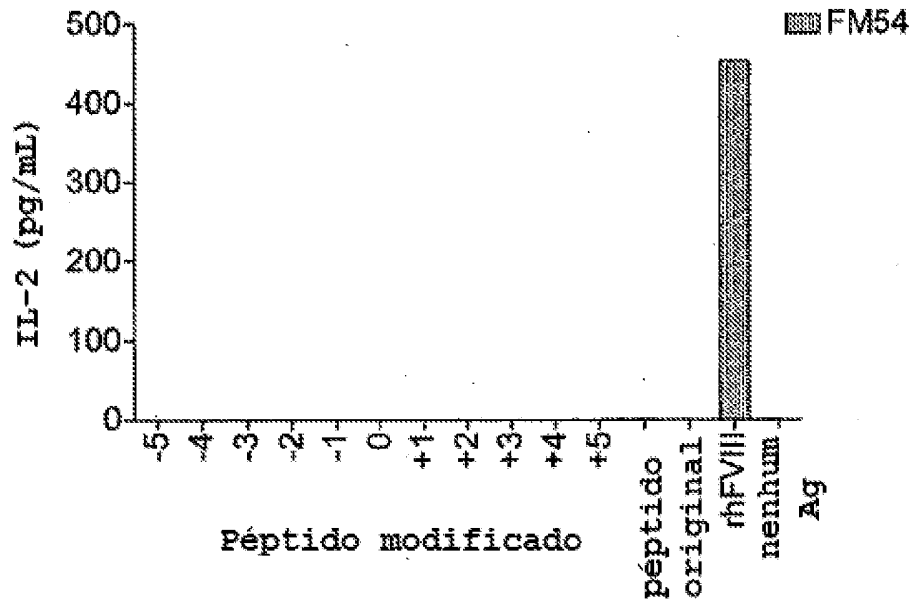


FIG. 7 (CONT'D)

Rastreo de péptido sobreposto PPIIA: FM54 (clone DR2)



Rastreo de péptido sobreposto DTLII: F-M69

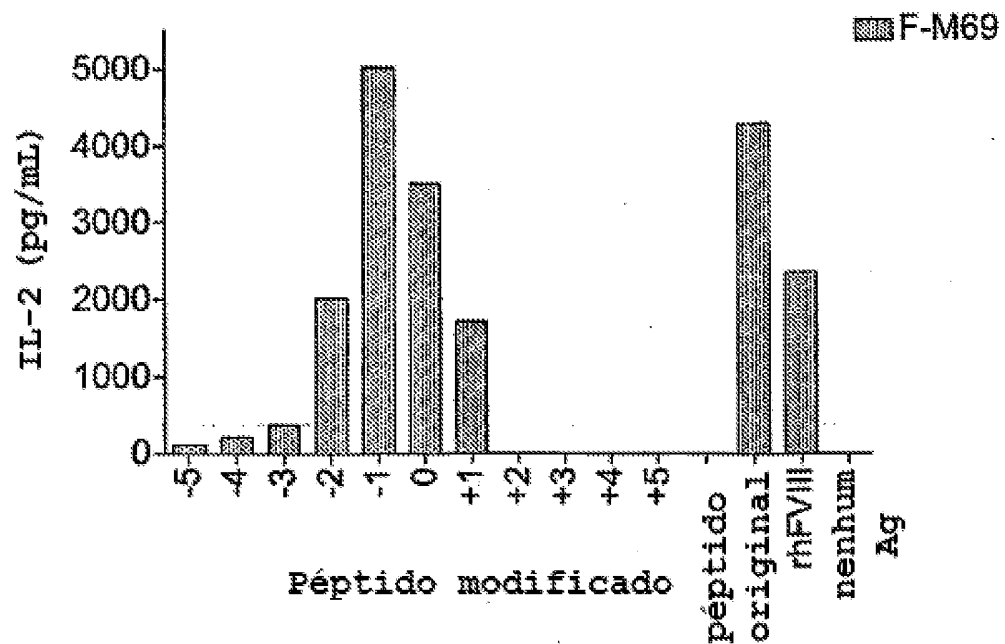


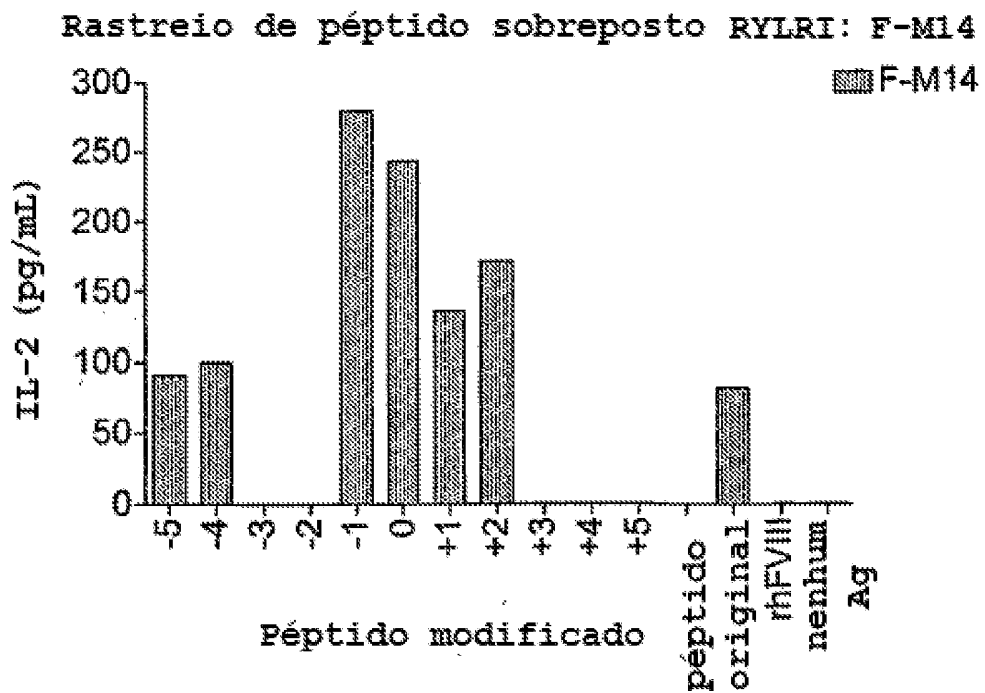
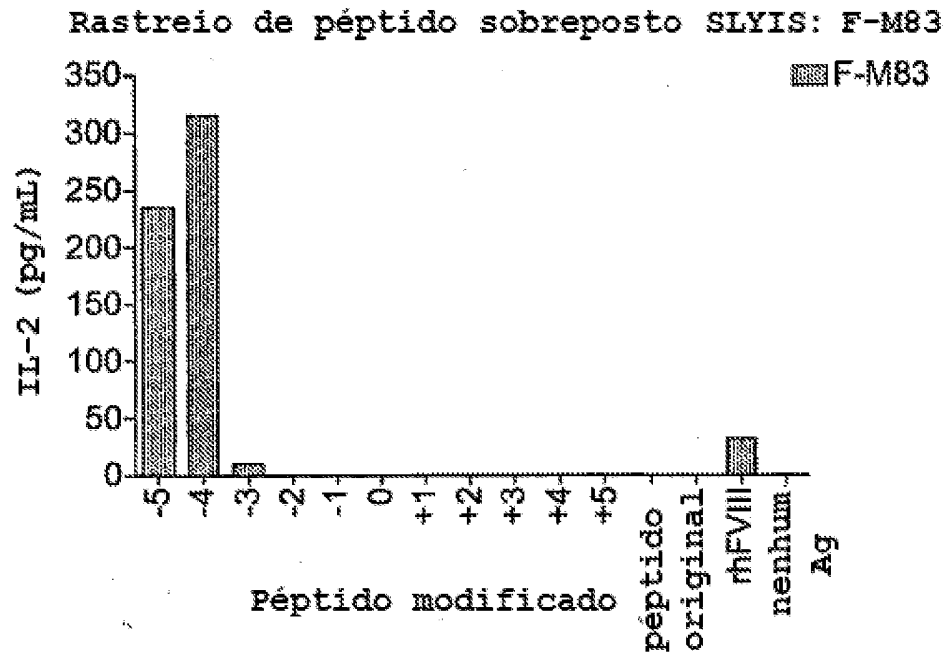
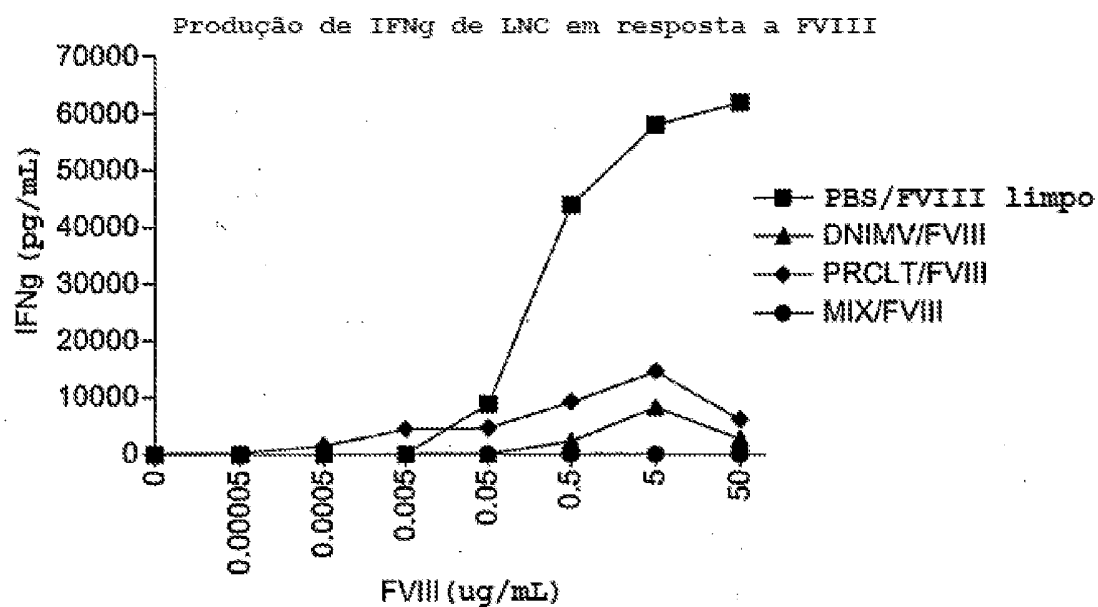
FIG. 7 (CONT'D)

FIG. 8



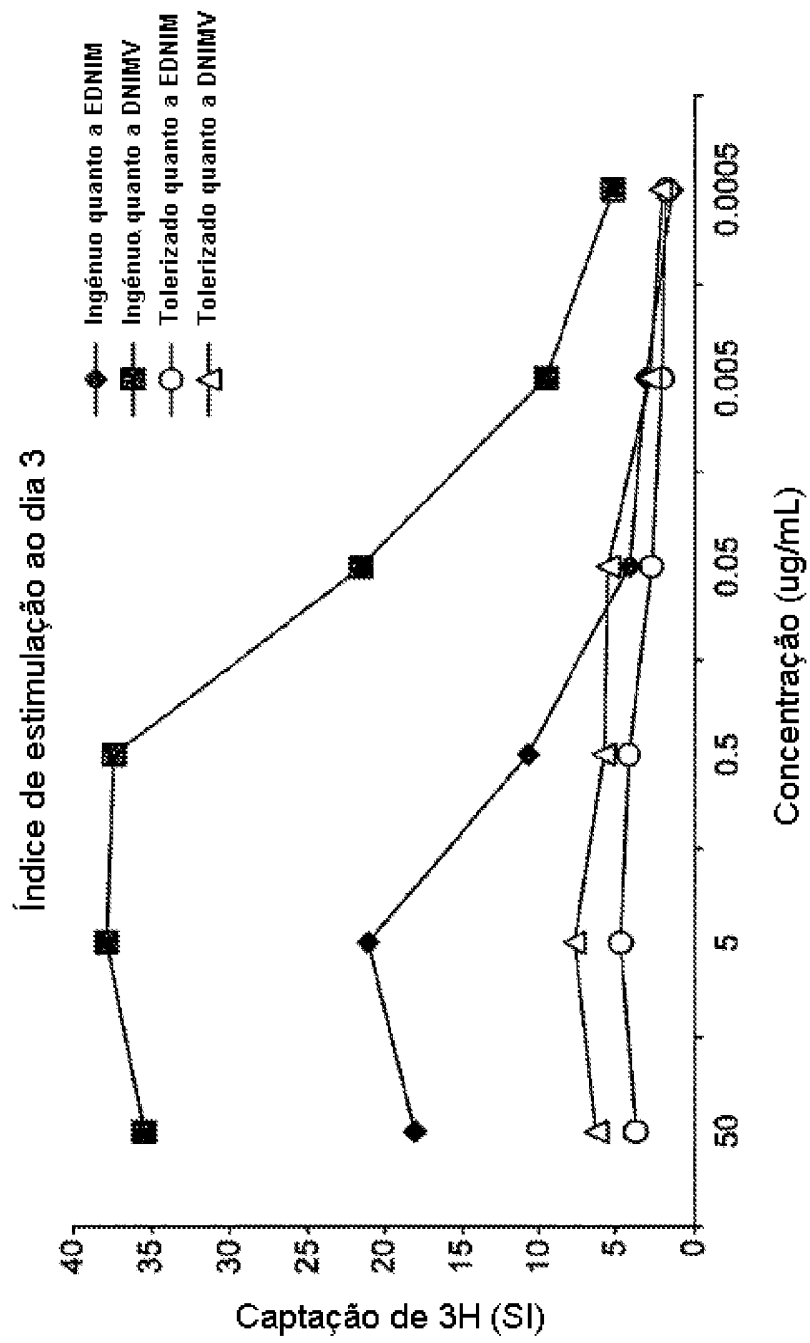


FIG. 9