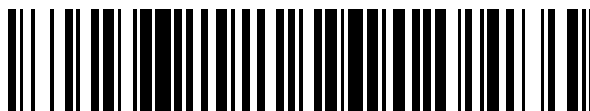


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 441**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2005 E 05701998 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1709070**

54 Título: **Péptidos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

30.01.2004 GB 0402129

23.02.2004 US 783095

25.02.2004 GB 0404199

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.12.2013

73 Titular/es:

KING'S COLLEGE LONDON (100.0%)

The Strand

London WC2R 2LS, GB

72 Inventor/es:

PEAKMAN, MARK

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 432 441 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

La presente invención se refiere a enfermedades autoinmunitarias y, más particularmente, a diabetes sacarina de tipo 1 (T1DM). El objetivo es el tratamiento de diabetes y otras clases de enfermedades autoinmunitarias usando combinaciones de péptidos novedosos y el uso de las mismas combinaciones de péptidos en bioensayos diseñados para monitorizar este y otras terapias específicas de diabetes. La invención se describirá más específicamente con relación a T1DM, pero la extensión de los principios novedosos descritos en la presente memoria para la terapia de otras enfermedades autoinmunitarias resultará evidente a partir de la descripción subsiguiente.

En T1DM, el sistema inmunitario destruye involuntaria y progresivamente las células del páncreas que preparan insulina (células β). Hay por tanto una pérdida de inmunotolerancia a las células β . Eventualmente, hay demasiadas pocas células β para asegurar una captación apropiada de la glucosa sanguínea por las células corporales y el paciente sufre diabetes clínica. Los inconvenientes del tratamiento actual para esta enfermedad son bien conocidos, y el esfuerzo de investigación se ha dirigido durante muchos años a conseguir una mejor comprensión del proceso patológico con vistas a producir procedimientos mejorados de diagnóstico temprano y terapias más eficaces. Una terapia eficaz sería aquella que restaurara la inmunotolerancia a células β . Este enfoque tendría que estar acompañado por un procedimiento complementario para la medida de la tolerancia a células β .

Es bien sabido que el ataque autoinmunitario a células β evoluciona mediante la ruta de MHC de clase II, en que las células presentadoras de antígeno (APC) procesan los antígenos de proteínas de células β relevantes y presentan sus epítopos peptídicos ante linfocitos T CD4+, induciendo así citocinas que ayudan a la destrucción de las células β . Un enfoque que se ha propuesto en el estudio de T1DM y otras enfermedades autoinmunitarias ha sido aislar (eluir) los epítopos eficaces del complejo de péptido y molécula de HLA de clase II y explorar el potencial de estos péptidos para diagnóstico y terapia. La patente de EE.UU. 5.827.516 está dirigida a este tipo de enfoque para un gran número de enfermedades y la patente de EE.UU. 6.562.943 aplica esta metodología a T1DM. La referencia a la literatura correspondiente al documento US 6.562.516 es Peakman *et al*, 1999, titulada "Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4", *J. Clin. Invest.* 104: 1449-1457. El término IA-2 indica proteína de tipo tirosina fosfatasa de islote.

Narendan P *et al.*, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2003; 19: 52-59, se refiere a las respuestas de anticuerpo y linfocito T contra proinsulina e identifica los epítopos de linfocitos T dominantes.

Intentos previos de encontrar una solución

Estas divulgaciones anteriormente mencionadas describen la utilidad prevista de estos péptidos aislados de diversos modos, por ejemplo, los siguientes:

(a) Como péptidos bloqueantes

Esta idea era que un péptido, por ejemplo uno que se une a la molécula DR4 de HLA de clase II (de aquí en adelante HLA-DR4), se uniría muy fuertemente a esta molécula de HLA y desplazaría los péptidos implicados en el proceso patológico, evitando así la activación de linfocitos T autorreactivos. Este enfoque se propuso en 1998, antes de apreciar completamente muchas de las complejidades del procesamiento antigénico para derivar péptidos presentados por moléculas de HLA. Por lo tanto, esta propuesta puede ser difícil de ejecutar por las siguientes razones. La manera en que un péptido natural podría bloquear la activación de linfocitos T es mediante intercambio competitivo, de modo que ocupe todos los sitios de unión a HLA posibles y desplace a otros péptidos ocupantes. Incluso el péptido de mayor unión tendría difícil competir para bloquear todos los demás ligandos de unión. El péptido tendría que competir fuera de la célula, donde no están disponibles enzimas catalíticas para ayudar al intercambio peptídico y donde el pH (aproximadamente de 7,4 extracelular, en contraposición a 5,0 intracelular) es muy desfavorable para el intercambio peptídico. Se estima que esto requeriría como mínimo varios miligramos de péptidos para conseguir una concentración suficientemente alta para una competencia eficaz. Puesto que las moléculas de HLA se renuevan en cuestión de minutos/horas sobre la superficie celular, el péptido competidor tendría que estar constantemente disponible.

Es altamente dudoso que el sistema pudiera soportar esta hipótesis y sabemos que no hay una bibliografía publicada que indique que dichos péptidos y dicha aplicación terapéutica y modo de acción se han realizado y usado. Además, dicho péptido bloqueante sería globalmente inmunosupresor, en lugar de específico de T1DM.

(b) Uso de péptidos alterados

Lo que se contemplaba en esta propuesta era alterar la secuencia peptídica natural para que siguiera uniéndose a la molécula de HLA pero, en lugar de activar linfocitos T, enviara una señal ligeramente diferente que anergizaría ("desconectaría") los linfocitos T, destruiría los linfocitos T o transformaría los linfocitos T en un tipo más benigno. En los años 90, estos ligandos peptídicos alterados (LPA) con propiedades antagonistas se consideraban altamente prometedores.

El enfoque de LPA continúa siguiéndose en enfermedades autoinmunitarias, aunque los ensayos tempranos en personas han sido menos alentadores. El problema parece ser que la alteración del péptido natural puede volverlo inmunogénico. En dos estudios en personas (en pacientes con la enfermedad autoinmunitaria esclerosis múltiple), los ensayos clínicos se detuvieron porque los pacientes desarrollaban respuestas inmunitarias alérgicas peligrosas al LPA. Estos resultados se reseñaron en la bibliografía científica en 2000 (ref. 1 y 2) a continuación. Un problema adicional era cómo identificar cuáles alteraciones serían exitosas. Este probó ser un trabajo largo y minucioso y no había indicaciones de cuál péptido elegir, cuál aminoácido alterar y a cuál cambiarlo.

1. Kappos, L., G. Comi, H. Panitch, J. Oger, J. Antel, P. Conlon y L. Steinman. 2000. "Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group". *Nat. Med.* 6: 1176.

2. Bielekova, B., B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J. A. Frank, H. F. McFarland y R. Martin. 2000. "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand". *Nat. Med.* 6: 1167.

Finalmente, es digno de mención que hasta la fecha no se ha descrito un bioensayo que sea capaz de medir la tolerancia a células β .

Principios generales de la invención

De acuerdo con la presente invención, los inventores han evitado los enfoques de la clase anterior y se ha centrado el esfuerzo de investigación en modos de usar péptidos para suprimir las células específicas implicadas en el desarrollo de esta enfermedad. Se ha concentrado en péptidos clave de preinsulina. Los inventores han desarrollado un enfoque multietapa, incorporando etapas y bioensayos novedosos para mostrar por primera vez que ciertos de estos epítomos peptídicos están implicados crucialmente en el desarrollo de T1DM y pueden utilizarse para conseguir protección natural de la enfermedad.

La presente invención está dirigida, en primer lugar, al problema de cómo inactivar específicamente los linfocitos T CD4+ patogénicos responsables de T1DM. Esto se consigue (a) identificando los péptidos específicos reconocidos por estas células y (b) usándolos en una modalidad terapéutica (denominada "inmunoterapia peptídica"). En inmunoterapia peptídica (ITP), el suministro de péptido nativo soluble conduce a la generación/expansión de linfocitos T CD4+ especializados que son reguladores. Los linfocitos T reguladores son capaces de una inhibición específica de las células que dañan los islotes mediante la liberación de citocinas antiinflamatorias, por ejemplo interleucina 10 (de aquí en adelante IL-10). Los linfocitos T reguladores que actúan mediante la liberación de IL-10 se denominan linfocitos Tr1. La inducción de linfocitos Tr1 mediante ITP es uno de los pocos enfoques terapéuticos que ofrece un resultado en que se restaura la tolerancia inmunológica a células β .

El segundo problema para el que se busca solución es cómo monitorizar el efecto de las terapias que se diseñan para inactivar los linfocitos T CD4+ responsables de T1DM. Dichas terapias incluyen ITP, pero también otros enfoques tales como fármacos inmunosupresores. Esta monitorización se consigue (a) identificando los péptidos específicos reconocidos por estos linfocitos T CD4+ y (b) usando los péptidos en un ensayo que mide el equilibrio de linfocitos T CD4+ patogénicos y supresores mediante las citocinas distintivas que producen. Dicho ensayo de tolerancia es crítico para el impulso general de prevenir la T1DM.

La inactivación de linfocitos T CD4+ patogénicos que reconocen péptidos específicos en los islotes es un reto difícil. Se han usado en el pasado dos enfoques. El primer y más ampliamente usado enfoque intenta suprimir todos los linfocitos T CD4+. Algunos de estos intentos han sido exitosos al mostrar que terapias orientadas a bloquear la función de linfocitos T CD4+ pueden detener la progresión de la diabetes. Este es un importante estudio preliminar. Sin embargo, el problema principal es que suprimir todos los linfocitos T CD4+ deja al paciente expuesto a un riesgo muy alto de infección y desarrollo de tumor, así como el problema de tratamiento con el fármaco a largo plazo, con todos los riesgos acompañantes que conlleva. La relación de riesgo a beneficio es por tanto demasiado baja para usar estos fármacos.

El segundo enfoque de inactivar los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno es mediante la administración de el antígeno entero, por ejemplo mediante inyección o por pulverizador nasal o por vía oral. Este enfoque se cree que conduce a la eliminación o supresión de linfocitos T patogénicos. Ha habido intentos con insulina y los ensayos publicados han sido infructuosos.

Un tercero modo sería administrar péptidos específicos del antígeno, como péptidos inalterados o como LPA. Los péptidos tienen numerosas ventajas frente al uso del antígeno entero. Los péptidos son fáciles de producir, formular farmacéuticamente y asegurar su calidad, no portan ninguno de los efectos secundarios biológicos de la molécula original y gramo a gramo proporcionan hasta 50 veces más componente activo (epítomo de linfocitos T) que el antígeno entero. Sin embargo, no hay estudios sobre péptidos de células β como productos terapéuticos para T1DM en personas.

Los inventores han resuelto estos problemas (concretamente, qué péptidos elegir para terapia y cómo monitorizar su efecto beneficioso) de los siguientes modos.

Para el problema de elegir cuáles péptidos naturales usar para terapia, se ha ampliado el enfoque descrito en la patente de EE.UU. 6.562.943 de cargar APC con antígeno para permitir su internalización e identificar los péptidos que se procesan naturalmente y se presentan ante linfocitos T CD4+. En este enfoque, los inventores han seleccionado la preproinsulina como presunto antígeno. Los inventores han ampliado adicionalmente el enfoque mediante la inclusión de un algoritmo que implica una serie de etapas analíticas, en que los péptidos naturales se seleccionan basándose en (a) la especificidad de células β ; (b) la afinidad por HLA-DR4; (c) el reconocimiento por linfocitos T CD4+ patogénicos y (d) el reconocimiento por linfocitos T CD4+ reguladores. Este enfoque proporciona la identidad de aquellos péptidos más importantes en la enfermedad y de mayor potencial para inmunoterapia. La metodología se describe a continuación, incluyendo la referencia a las Tablas y Figuras adjuntas.

Sumario de la invención

La invención proporciona péptidos, composiciones, procedimientos y usos como se especifican en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1. Uso de péptidos de IA-2 y de preproinsulina para identificar linfocitos T CD4+ patogénicos (IFN- γ). La gráfica muestra el porcentaje de casos de HLA-DR4 sensibles, entre pacientes de diabetes sacarina de tipo 1 (T1DM) (barras sombreadas) y sujetos no diabéticos de control (barras blancas), a cada péptido de IA-2 y de preproinsulina (PI) individual, así como la respuesta ante combinaciones de péptidos de uno o varios antígenos. Ocurre la mayor discriminación entre pacientes y controles que usan esos últimos péptidos cuando se combinan C19-A3 de PI con 709-36, 752-75 y 853-72 de IA-2, a lo que responden un 76% de los pacientes y un 7% de los controles ($p=0,0001$). Número de pacientes: 25, controles: 14.

Figura 2. Uso de péptidos de IA-2 y de preproinsulina y de ELISPOT de IL-10 para identificar linfocitos T CD4+ antiinflamatorios no patogénicos (secretores de IL-10) (protectores). La gráfica muestra el porcentaje de casos de HLA-DR4 sensibles, entre pacientes de T1DM (barras sombreadas) y sujetos no diabéticos de control (barras blancas), a cada péptido de IA-2 y de preproinsulina (PI) individual, así como la respuesta a combinaciones de péptidos de uno o varios antígenos mediante la producción de solo IL-10. Ocurre la mayor discriminación entre pacientes y controles que usan esos últimos péptidos cuando se combinan C19-A3 de PI con 709-36, 752-75 y 853-72 de IA-2, a lo que responden un 64% de los pacientes y un 0% de los controles ($p=0,0001$). Número de pacientes= 25, controles = 14.

Figura 3. Uso de péptidos y ELISPOT de IFN- γ e IL-10 para identificar linfocitos T CD4+ patogénicos y protectores en formato de un solo ensayo. Desarrollo de un ensayo que discrimina los pacientes de diabetes de tipo 1 de los controles sanos basándose en su polarización de las respuestas de linfocitos T CD4+ autorreactivos ante péptidos de IA-2 y PI. Se muestra el resultado del bioensayo de ELISPOT de citocinas para pacientes con T1DM (círculos blancos) y sujetos de control no diabéticos (triángulos negros). Para cualquier respuesta de péptido positiva dada (índice de estimulación $\geq 3,0$ para IFN- γ o IL-10), se ha representado el índice de estimulación para cada citocina. Existe una correlación inversa altamente significativa entre las respuestas representadas por cada una de estas citocinas ($p=0,000004$), indicando una extrema polarización de la autorreactividad proinflamatoria y reguladora. Los pacientes con T1DM se agrupan cercanos al eje y, y los sujetos de control no diabéticos se distribuyen a lo largo del eje x, indicando la asociación de estados patológico y tolerante con respuestas proinflamatorias y reguladoras, respectivamente.

Figura 4. La presencia de linfocitos T CD4+ antiinflamatorios (IL-10) retarda el inicio de la diabetes, indicando que estas células tienen un efecto protector mediante la supresión de linfocitos T CD4+ patogénicos. Esto se muestra por la relación entre edad al inicio de la T1DM y producción de IL-10 en respuesta a los péptidos de IA-2 y de preproinsulina. De los pacientes ensayados, aquellos que producen respuestas de IL-10 son significativamente mayores ($p=0,01$). Esto proporciona evidencias de que los linfocitos T CD4+ productores de IL-10 antiinflamatorio que responden ante péptidos de IA-2 y PI retardan el inicio de la diabetes.

Figura 5. Ilustración de la estrategia multietapa secuencial para la identificación de los péptidos de preproinsulina claves para uso en inmunoterapia peptídica.

Metodología

La metodología se detalla según la estrategia/logaritmo mostrado en la Figura 5.

1.1. Identificación de péptidos de preproinsulina procesados naturalmente y presentados por HLA-DR4

Se clonó ADNc que representa la secuencia completa de preproinsulina (embl locus HSPPI, acceso X70508.1) en un vector pET-12a (Novagen Inc, Madison WI) modificado para incluir un marcador de purificación por 6-histidina y una secuencia de biotilación en el extremo 5' y se transformó en células competentes BLR(DE3)pLysS (Novagen

Inc) para expresión y purificación en condiciones desnaturalizantes, seguido de replegamiento usando una reacción redox con glutation y confirmación del plegamiento correcto mediante análisis de los productos de digestión de proteasa V8. Se suministró preproinsulina recombinante a la superficie de APC (linfocitos B de Priess transformados con virus de Epstein Barr (EBV), homocigóticos de DRB1*0401 permisivo de DM de tipo 1 [DR4/DRw53], genotipo DQA1*0301/DQB1*0302 [DQ8]) y se purificó por HLA-DR4.

Se consiguió el suministro de preproinsulina a la superficie celular a alta concentración usando un sistema de suministro de antígeno (SSA) que comprende mitógeno de fitolaca biotinilado (b-PWM) que se une preferentemente a restos carbohidrato sobre receptores de superficie con dominios de tipo inmunoglobulina, tales como el complejo receptor de linfocitos B en linfocitos B transformados con EBV, como se describe en Peakman *et al.*, 1999. Se usó entonces avidina como puente entre el b-PWM unido a superficie celular y la preproinsulina biotinilada. Se recogieron linfocitos B de Priess con EBV, se lavaron, se contaron y se resuspendieron a 10^8 /ml en hielo. Se sometieron entonces las células a pulsos secuenciales en hielo durante 30 minutos con cada componente del SSA a concentraciones óptimas, que comprenden b-PWM (Sigma Chemical Co, UK); 1 μ g/ml, avidina-D (Vector Laboratories; 2 mg/ml) y preproinsulina biotinilada recombinante (20 μ g/ml), con dos etapas de lavado con tampón frío en exceso entre cada pulso. Se incubaron entonces los linfocitos de Priess pulsados en RPMI 1640/10% de FCS (Life Technologies) a 10^5 /ml durante 1 o 6 horas a 37°C y 5% de CO₂. En condiciones idénticas, se sometieron a pulsos un número equivalente de linfocitos de Priess con b-PWM/avidina-D pero no sin preproinsulina biotinilada (células de control). Al final del periodo de incubación, se lavaron los linfocitos de Priess pulsados y se almacenaron a -80°C.

Se purificó HLA-DR4 a partir de sedimentos de linfocitos de Priess pulsados con SSA como sigue. Brevemente, se homogeneizaron los sedimentos celulares en tampón hipotónico y se solubilizó una fracción de membrana bruta en NP-40 al 4% (Sigma Chemical Co.). Se pasó la fracción soluble a detergente por una serie de columnas de inmunoadfinidad preparadas con mAb específicos de proteínas de HLA de clase I (W6/32), HLA-DR (L243) acopladas con proteína A-Sepharose y HLA-DQ8 (IVD12) acoplada con Affigel-10 (Bio-Rad, Hemel Hempstead, RU). Se eluyeron las columnas de inmunoadfinidad con glicina 50 mM, pH 11,5, 0,1% de desoxicolato de sodio, se neutralizaron inmediatamente y se dializaron frente a Tris 10 mM, pH 8,0, 0,1% de desoxicolato de sodio. La HLA-DR4 era >98% pura como se valoró por PAGE-SDS. Inmediatamente antes de la extracción ácida de los péptidos unidos, se pasó una alícuota de 0,5 mg de proteína HLA a través de una columna de exclusión por tamaño de HPLC (ProGel TSK G2000 SW, 7,5 x 300 mm) equilibrada con Tris 10 mM, pH 7,5, para retirar las moléculas no unidas específicamente a proteína HLA. Se concentraron las fracciones que contenían las proteínas HLA-DR4 a 100 μ l por ultrafiltración (Centricon 10, Amicon, MA).

Se eluyeron con ácido los inventarios de péptidos procesados naturalmente mediante incubación durante 15 minutos a 70°C con 800 μ l de ácido acético al 10% y se aislaron de la proteína HLA restante mediante ultrafiltración a través de Centricon 10. Se concentraron a vacío los péptidos extraídos con ácido a aproximadamente a 20-30 μ l y se separaron por HPLC-FI usando una columna Microbore C₁₈ (1,0 x 250 mm; Vydac, Hesperia, CA) a 50-200 μ l/minuto. Se secaron al aire las muestras, se cargaron aproximadamente al 2% en una placa de muestra junto con 0,4 μ l de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 10 mg/ml en 50% de acetonitrilo/0,1% de ácido trifluoroacético) y se dejaron secar al aire. Se recogieron los espectros de masas a las intensidades láser óptimas promediando las señales iónicas de 256 barridos individuales en modos tanto lineal como reflector usando un espectrómetro de masas-tiempo de vuelo-reflector de longitud extendida de una etapa (Voyager Elite XL; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Se efectuó la conversión de tiempo a masa mediante calibración externa usando péptidos sintéticos. La precisión de masa variaba de 0,03% a más de 0,01% en los modos lineal y reflector, respectivamente.

Se compararon los espectros de masas del inventario de péptidos de HLA-DR4 aislado de linfocitos de Priess pulsados con preproinsulina y preparación de control para identificar valores de m/z novedosos correspondientes a péptidos derivados de preproinsulina. Se identificaron 5 masas por ser únicas de la preparación de péptido pulsado con preproinsulina, correspondientes a 7 secuencias de preproinsulina (véase la Tabla 1). Todas las secuencias abarcan una región extendida de preproinsulina desde el final de la cadena B a la mitad de la cadena A. Los péptidos limitaban dos conjuntos anidados potenciales que son característicos del procesamiento de MHC de clase II (C3-C27 y C13-A5).

Se aplicó entonces una segunda etapa de selección para los péptidos de preproinsulina de interés terapéutico usando la siguiente estrategia. El ataque inmunitario en diabetes de tipo 1 está dirigido solo contra las células β . La preproinsulina es única de células β . En contraposición, en virtud del hecho de que es una hormona secretada necesaria para la actividad biológica en todo el cuerpo, la insulina (y su cadena conectora secretada desechada, el péptido C) tiene una distribución ubicua. Por lo tanto, se clasificaron los péptidos eluidos por su presencia solo en preproinsulina, frente a la presencia en preproinsulina e insulina/péptido C. 5 de las secuencias satisfacían el criterio (SEQ ID NO: 1 y 4-7) de estar presentes solo en preproinsulina.

Se aplicó una etapa de selección adicional basada en la siguiente iniciativa novedosa. Solo aquellas secuencias de péptidos de preproinsulina con alta afinidad mensurable por HLA-DR4 tendrían potencial inmunoterapéutico peptídico. Por lo tanto, se valoró en los péptidos de preproinsulina sintéticos basados en las secuencias de los 5 candidatos su capacidad de unirse a HLA-DR4 soluble *in vitro* en un ensayo de unión competitiva directa frente a un péptido indicador biotinilado (98-117 de la cadena invariable de MHC de clase II) como sigue. Las moléculas de

HLA-DR4 usadas en este ensayo se purificaron a partir de sedimentos de linfocitos de Priess no manipulados en reposo usando el enfoque de columna de inmunoafinidad descrito anteriormente en el procedimiento 1.1. Para efectuar el ensayo de unión, se incubaron 12 µg de HLA-DR4 purificada por inmunoafinidad con péptido indicador biotinilado 2,5 µM y péptido de ensayo o péptido indicador no biotinilado a un intervalo de concentraciones (0,1-100 µM) a una concentración final de DMSO del 20% en ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 20 mM, 1% p/v de n-octilglucósido, cloruro de sodio 140 mM, 0,05% de azida de sodio, pH 5, durante 20 horas a temperatura ambiente. Se transfirieron las mezclas de péptidos a pocillos de una placa Maxisorp (Nalge Nunc, Hereford, RU) que se había prerrecubierto durante 20 horas a temperatura ambiente con 100 µl de anticuerpo de captura anti-HLA-DR (L243) a 10 µg/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se bloquearon con leche desecada desnatada al 3% y seroalbúmina bovina al 3% (BSA) durante 30 minutos cada una y se lavaron 5 veces en disolución salina tamponada con Tris (TBS)/0,1% de Tween-20 (todos los productos químicos son de Sigma Chemical Company, Poole, Dorset). Se incubaron las placas durante 1 hora adicional a temperatura ambiente y se lavaron 5 veces con TBST. Se añadió estreptavidina conjugada con europio (Perkin Elmer Ltd., Hounslow, RU) a 1 µg/ml en tampón de ensayo de fluoroinmunoensayos de resolución temporal y disociación potenciada (DELFLIA) (Wallac Oy, Turku, Finlandia) y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos 5 veces adicionales con TBST y 100 µl de solución de potenciación DELFLIA añadidos a cada pocillo. Se midió la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro DELFLIA.

Se expresó la afinidad de unión como la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀), determinada como aquella necesaria para inhibir un 50% la unión de péptido indicador biotinilado 2,5 µM. Se seleccionaron solo aquellos péptidos con alta afinidad por HLA-DR4 (CI₅₀ <10 µM). Uno de los conjuntos anidados de péptidos (C13-A5), que contenía 3 secuencias peptídicas (SEQ ID NO: 4-6), satisfacía estos criterios. Los resultados de este análisis por etapas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Masas observadas experimentalmente y calculadas de péptidos derivados de preproinsulina eluidos de HLA-DR4 y sus secuencias coincidentes

| m/z observada | m/z calculada | precisión de masa (ppm) | residuos en preproinsulina | secuencia | CI ₅₀ para unión a HLA-DR4 (µM) |
|---------------|---------------|-------------------------|----------------------------|--|--|
| 2336.970 | 2337.216 | 85.8 | B27-C15 | TPKTRREARDLQVGQVELGGGP (SEQ ID NO: 1) | 50 |
| 2305.312 | 2305.203 | 77.9 | C3-C26 | EDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLAL (SEQ ID NO: 2) | 3 |
| 2305.312 | 2305.203 | 77.9 | C4-C27 | DLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE (SEQ ID NO: 3) | 3 |
| 1836.922 | 1836.981 | 32.3 | C13-C32 | GGGPGAGSLQPLALEGSLQK (SEQ ID NO: 4) | 5 |
| 1865.546 | 1866.081 | 286.5 | C19-A3 | (SEQ ID NO: 5) GSLQPLALEGSLQKRGIV | 0.5 |
| 1865.546 | 1866.044 | 267.0 | C22-A5 | (SEQ ID NO: 6) QPLALEGSLQKRGIVEQ | 0.4 |
| 2224.543 | 2225.072 | 250.0 | C25-A12 | (SEQ ID NO: 7) ALEGSQKRGIVEQCCTSI | 10 |

Secuencia de proinsulina:

cadena B **péptido C** **cadena A**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR-R EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ K-R GIVEQCCTSI
(SEQ ID NO: 8)

Notas: Los cuadros encierran conjuntos anidados potenciales en que el aminoácido en **negrita** representa el residuo P1 más probable; en la secuencia de preproinsulina, los motivos **dibásicos R-R y K-R** representan los sitios de escisión para la retirada de péptido C y estos residuos se retiran posteriormente por peptidasas

Los péptidos de SEQ ID N° 1 a 7 mostrados en la Tabla 1 anterior son aquellos presentados por DR4 y derivados por procesamiento celular. Se entenderá que estos no constituyen epítomos (concretamente, no se proporcionan evidencias solo por la elución de que estos péptidos se reconozcan por linfocitos T CD4) y por lo tanto no tienen relevancia patológica tomados solos. No puede concluirse solo a partir de estos datos que cualquiera de estos péptidos tenga utilidad terapéutica con los fines de la presente invención.

1.2. Segunda fase de identificación de péptidos de potencial terapéutico mediante análisis de las respuestas del paciente ante péptidos candidatos usando ELISPOT de IFN-γ

El enfoque de cribado inicial de los inventores determina cuáles péptidos se presentan naturalmente, cuáles tienen excelentes características de unión a HLA-DR4 y, en el caso de preproinsulina, cuáles secuencias son únicas de esta molécula y están ausentes en insulina madura, pero no aquellas contra las que los linfocitos T CD4+ patogénicos reaccionan durante la respuesta inmunitaria que conduce a T1DM. Para resolver este problema, los

inventores han tomado los péptidos candidatos de preproinsulina y otros identificados de IA-2 dados a conocer en Peakman *et al.* 1999 y se han ensayado cada uno de estos individualmente en un formato de ensayo llamado ELISPOT de citocina. Este detecta la firma del linfocito T CD4+ según la citocina que produce. Producir interferón y (IFN- γ) representa una respuesta de linfocitos T CD4+ patogénicos. Los péptidos importantes desde el punto de vista patológico son aquellos que desencadenan una respuesta patogénica en este ensayo. Por lo tanto, este es un refinamiento muy crítico del enfoque sencillo de identificación de epítomos anterior, porque revela cuáles epítomos son importantes en el contexto patológico. Anteriormente a la presente invención, este enfoque no se había dado a conocer ni llevado a cabo anteriormente con péptidos de IA-2 ni ningún otro péptido.

Procedimiento de ensayo ELISPOT de interferón γ

10 Se obtuvo sangre heparinizada reciente de 25 pacientes de DM de tipo 1 blancos con HLA-DR4 y síntomas de inicio agudo, que requieren insulina desde el diagnóstico, y de 14 sujetos de control sanos no diabéticos de edad y tipo de HLA coincidentes. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recientes por gradiente de densidad (Lymphoprep, Nycom Pharma, Noruega) y se lavaron con RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, RU) dos veces antes del uso. Se dispensaron PBMC recientes en RPMI 1640 suplementado con antibióticos (medio TC; todos de Life Technologies) y 10% de suero AB humano (Harlan SeraLab, Leicestershire, RU) a placas de 48 pocillos a una densidad de 2×10^6 en 0,5 ml suplementados con el péptido seleccionado a una concentración final 10 μ M y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ inclinados 5°. Los pocillos de control comprendían medio TC que contenía una concentración equivalente de diluyente peptídico solo (DMSO), toxoide del tétanos (concentración final 100 ng/ml) o PMA/ionomicina (concentraciones finales 5 ng/ml y 745 ng/ml, respectivamente).

20 El día +1, se añadieron 0,5 ml de medio TC precalentado/10% de AB y el día +2 se resuspendieron las células no adherentes usando medio TC precalentado/2% de AB, se lavaron, se llevaron a una concentración de $1 \times 10^6/300 \mu$ l y se dispensaron 100 μ l por triplicado en pocillos de placas ELISA de 96 pocillos (Nunc Maxisorp, Merck, Poole, RU) prebloqueados con 1% de BSA en PBS y prerrecubiertos con anticuerpo monoclonal de captura anti-IFN- γ (U-Cytech, Utrecht, Holanda). Después de la captura a 37°C y 5% de CO₂ durante 7 horas, se lisaron las células en agua enfriada con hielo, se lavaron las placas con PBS/Tween 20 y se revelaron los puntos usando anticuerpo de detección anti-IFN- γ y un agente de revelado apropiado. Se secaron las placas y se contaron los puntos de 80-120 μ m en un BioReader 3000 (BioSys, Karben, Alemania). Se compararon los valores medios en los pocillos de ensayo con las medias de los pocillos de fondo (DMSO) para derivar un índice de estimulación (IE).

30 Se resumen los resultados en la Figura 1 y la Tabla 3. La Figura 1 muestra el porcentaje de pacientes diabéticos y de controles que responden mediante la producción de IFN- γ a uno u otro de los 6 péptidos de IA-2 y 3 péptidos de preproinsulina. Los resultados demuestran que cada uno de los tres péptidos de preproinsulina ensayados desencadena el tipo de respuesta inmunitaria asociada a un linfocito T patogénico. Resulta evidente que las respuestas son más prevalentes en pacientes y que se observa la máxima potencia discriminativa (entre pacientes y controles) cuando se usan un mínimo de 1 péptido de preproinsulina (C19-A3) y 3 péptidos de IA-2 (709-736, 752-775 y 853-872). En combinación, estos péptidos particulares representan por tanto un cóctel que tiene la relevancia patológica máxima conseguible.

40 Entre los 25 pacientes ensayados contra paneles de péptidos de IA-2 y PI, se observó una respuesta de IFN- γ ante al menos un péptido en 18/25 (72%) pacientes de T1DM, en comparación con 1/14 (7%) de sujetos de control no diabéticos ($p=0,0001$). Este aumento de la sensibilidad de diagnóstico no se consiguió con pérdida de especificidad, puesto que ninguno de los sujetos de control no diabéticos producía respuestas de IFN- γ ante ninguno de los péptidos de PI. Globalmente, las respuestas ante péptidos de IA-2 y PI, que se habían identificado por elución a partir de HLA-DR4, tendían a ser mayores en pacientes con al menos un alelo codificante de HLA-DR4. Por tanto, 15/25 (60%) y 10/17 (59%) pacientes con al menos una molécula de HLA-DR4 respondían ante al menos un péptido de IA-2 o PI respectivamente, en comparación con 4/11 (36%) y 4/8 (50%) de pacientes sin alelos de DR4. De forma similar, la prevalencia de respuestas ante cualquier panel peptídico era mayor entre aquellos pacientes con al menos un alelo de HLA-DR4 (13/17, 76%) en comparación con aquellos sin alelos de DR4 (5/8, 63%), aunque ninguna de estas tendencias era significativa con los números de casos ensayados en este estudio. Se llevaron a cabo estudios adicionales usando muestras de 4 sujetos de T1DM con linfocitos T reactivos con péptido de islote para examinar la naturaleza de las células sensibles. Las respuestas positivas (IE $\geq 3,0$) se anularon completamente cuando se agotaron los linfocitos T CD4 de PBMC, indicando que los linfocitos T autorreactivos detectados son CD4+. Además, se pudo examinar la persistencia de las respuestas de linfocitos T de IFN- γ en 4 pacientes de T1DM adicionales (todos DRB1*0401) de los que estaba disponible una segunda muestra de sangre 15-23 semanas después de la primera. En tres pacientes, había una respuesta de linfocitos T de IFN- γ positiva (IE $\geq 3,0$) en la primera muestra ante al menos un péptido de IA-2. En dos de estos pacientes, las respuestas positivas permanecieron, mientras que en el tercero la respuesta ante un péptido persistió y ante el otro desapareció. El cuarto paciente no mostró respuesta ante ninguna muestra. Estos resultados indican que, cuando están presentes, las respuestas de linfocitos T autorreactivos proinflamatorios tienen tendencia a persistir durante los primeros meses después del diagnóstico.

Resumiendo estos resultados, existe una clara asociación entre las respuestas de IFN- γ patogénico detectable ante péptidos de preproinsulina e IA-2 seleccionados y el diagnóstico de diabetes de tipo 1.

60

Tabla 3. Prevalencia de las respuestas de IFN-γ ante péptidos de IA-2 y PI en pacientes de T1DM y sujetos de control no diabéticos

| | Respuestas ante secuencias peptídicas de IA-2 (IE) | | | | | | Respuestas ante secuencias peptídicas de proinsulina (IE) | | |
|--|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---|--------------|--------------|
| | 652-80 | 709-36 | 752-75 | 793-817 | 853-72 | 955-76 | C13-32 | C19-A3 | C22-A5 |
| Pacientes de T1DM con alelos de HLA-DR4 | | | | | | | | | |
| #1 | | | | | 10.0% | | | | |
| #2 | 3.1% | | | | | | | | |
| #3 | 3.0% | | 4.3% | 9.7% | 10.2% | 4.7% | | 10.7% | |
| #4 | | | 5.5% | | 3.0% | | | 3.5% | |
| #5 | 6.2% | | | | | | 3.8% | | 3.7% |
| #6 | 2.3% | 9.2% | | | 6.6% | 11.2% | 8.6% | 63.6% | 22.0% |
| #7 | 6.4% | | | | | | | | |
| #8 | | | | | | | | | |
| #9 | | | | | 5.2% | | | 3.0% | |
| #10 | | | 12.3% | | | | | 4.6% | |
| #11 | | | | | | | | 5.0% | |
| #12 | | | 4.9% | | | | | 3.3% | |
| #13 | | | 3.4% | 4.1% | 3.6% | | | 10.7% | |
| #14 | | | | | | | | | 3.3% |
| #15 | | | | | | | | | |
| #16 | | | | | | | | | |
| #17 | | | | | | | | | |
| #18 | | | | | | | | | |
| #19 | | 5.0% | 7.0% | 19.0% | | 3.0% | | | |
| #20 | | | 2.5% | | | | | | |
| #21 | | | | | | | | | |
| #22 | | | | | | | | | |
| #23 | | | 0.6% | | | | | | |
| #24 | 6.0% | 10.5% | | | 4.8% | 3.0% | | | |
| #25 | | | | | | | | | |
| Totales (%) | 6/25 (24) | 3/25 (12) | 8/25 (32) | 3/25 (12) | 7/25 (28) | 4/25 (16) | 2/17 (12) | 8/17 (47) | 3/17 (18) |
| Pacientes de T1DM con alelos no DR4 | | | | | | | | | |
| #26 | | | 3.0% | | | 5.0% | | 3.3% | |
| #27 | 16.7% | | | | 3.3% | | | | |
| #28 | | | | | | | 11.5% | 5.0% | 3.3% |
| #29 | | | | | | | | | 4.0% |
| #30 | | | | | | 2.4% | | 5.7% | |
| #31 | | | | | | | | | |
| #32 | | | | | | | | | |
| #33 | | | | | | | | | |
| #34 | | | | | 1.7% | | | | |
| #35 | | | | | | | | | |
| #36 | | | | | | | | | |
| Totales (%) | 1/11 (9) | 0/11 (0) | 1/11 (9) | 0/11 (0) | 2/11 (18) | 2/11 (18) | 2/8 (25) | 3/8 (38) | 2/8 (25) |
| Sujetos de control no diabéticos | | | | | | | | | |
| C1 | | | | | | | | | |
| C2 | | | | | | | | | |
| C3 | | | | | | | | | |
| C4 | | | | | | | | | |
| C5 | | | | | | | | | |
| C6 | | | | | | | | | |
| C7 | | | | | | | | | |
| C8 | | | | | | | | | |
| C9 | 3.8% | | | | 4.9% | | | | |
| C10 | | | | | | | | | |
| C11 | | | | | | | | | |
| C12 | | | | | | | | | |
| C13 | | | | | | | | | |
| C14 | | | | | | | | | |
| Totales (%) | 1/14 (7) | 0/14 (0) | 0/14 (0) | 0/14 (0) | 1/14 (7) | 0/14 (0) | 0/14 (0) | 0/14 (0) | 0/14 (0) |

-: no realizado. IE: índice de estimulación; véanse los procedimientos para detalles. Los números en cuadros sombreados indican IE.

1.3 Tercera fase de identificación de péptidos de preproinsulina de potencial terapéutico mediante el análisis de las respuestas del paciente ante péptidos candidatos usando ELISPOT de IL-10

5 En la etapa final de selección de péptidos, se buscó identificar aquellos péptidos con eficacia potencial en la manipulación denominada "inmunoterapia peptídica". Como se afirma anteriormente, este enfoque terapéutico ejerce su efecto mediante la inducción/agrupación de linfocitos T CD4+ reguladores (linfocitos Tr1) que producen IL-10 y suprimen la inflamación activa en enfermedad autoinmunitaria. Dichas células pueden detectarse usando ELISPOT de IL-10. Se buscaron linfocitos Tr1 específicos de péptido productores de IL-10 en un grupo de pacientes con T1DM, algunos de los cuales tenían un inicio temprano de la enfermedad y algunos de los cuales tenían un inicio tardío de la enfermedad.

10 El objetivo de los inventores fue el identificar péptidos reconocidos por linfocitos Tr1 en pacientes con enfermedad de inicio tardío. La enfermedad que aparece en una etapa tardía es probable que refleje una destrucción lenta de células β , asociada a intentos del sistema inmunitario de regular los linfocitos T patogénicos (por ejemplo, la inducción de linfocitos T reguladores). Los inventores buscaron identificar los péptidos reconocidos por linfocitos T reguladores. El procedimiento usado es idéntico al de la sección 1.2, aparte de las siguientes diferencias:

15 El día +1, se añadieron 0,5 ml de medio TC precalentado/10% de AB y el día +2 se resuspendieron las células no adherentes usando medio TC precalentado/2% de AB, se lavaron, se llevaron a una concentración de $1 \times 10^6/300 \mu\text{l}$ y se dispensaron $100 \mu\text{l}$ por triplicado en pocillos de placas ELISA de 96 pocillos (Nunc Maxisorp, Merck, Poole, RU) prebloqueadas con 1% de BSA en PBS y prerrecubiertas con anticuerpo de captura anti-IFN- γ o monoclonal anti-IL-10 (U-Cytech, Utrecht, Holanda). Después de la captura a 37°C y 5% de CO_2 durante 7 horas, se lisaron las células en agua enfriada con hielo, se lavaron las placas con PBS/Tween 20 y se revelaron los puntos usando anticuerpo de detección anti-IFN- γ o anti-IL-10 y un agente de revelado apropiado. Se secaron las placas y se contaron los puntos de 80-120 μm en un BioReader 3000 (BioSys, Karben, Alemania). Se compararon los valores medios en los pocillos de ensayo con las medias de los pocillos de fondo (DMSO) para derivar el índice de estimulación (IE).

25 Se muestran los resultados en la Tabla 4 y las Figuras 2 y 4. La Figura 2 muestra el porcentaje de pacientes diabéticos y controles sensibles con producción solo de IL-10 ante uno u otro de los 6 péptidos de IA-2 y 3 péptidos de preproinsulina. Los resultados demuestran que cada uno de los tres péptidos de preproinsulina ensayados desencadena el tipo de respuesta inmunitaria asociado a linfocitos T reguladores. Resulta también evidente que las respuestas son más prevalentes en pacientes no diabéticos y que se observa la máxima potencia discriminativa (entre pacientes y controles) cuando se usan el mínimo de 1 péptido de preproinsulina (C19-A3) y 3 péptidos de IA-2 (709-736, 752-775 y 853-872). En combinación, estos péptidos representan por tanto los más relevantes para identificar el fenotipo protector.

35 Fue un hallazgo llamativo que más de la mitad de los sujetos de control no diabéticos (9/14, 64%) produjera respuestas de IL-10 ante péptidos de IA-2, en comparación con una minoría de pacientes con T1DM recién diagnosticada (7/24, 29%; $p < 0,05$, Tabla 4). Estas respuestas estaban frecuentemente dirigidas contra epítopos múltiples y eran de considerable magnitud. El ensayo repetido un mes después en 4 de los sujetos de control no diabéticos mostró que la respuesta de IL-10 era reproducible con el tiempo (concretamente, 4/4 sujetos mostraron respuestas clasificadas como positivas, $\text{IE} \geq 3,0$ ante los mismos péptidos que en el ensayo original).

40 Resumiendo estos datos sobre respuestas de IL-10, existe una clara tendencia de respuesta de IL-10 contra péptidos de IA-2 para discriminar pacientes y sujetos de control ($p < 0,05$). Esta tendencia permanece para las respuestas anti-IA-2 y anti-preproinsulina ($p = 0,08$) cuando se consideran solo los casos de HLA-DR4 y controles (consistente con los péptidos eluidos de DR4, al ser más discriminatorios entre los sujetos de DR4). Las respuestas de IL-10 ante preproinsulina parecen no discriminatorias, aunque se estudiaron pocos casos.

45 Los inventores realizaron el descubrimiento adicional de que los pacientes con T1DM que producían respuestas de IL-10 ante péptidos de IA-2 o preproinsulina tendían a ser significativamente mayores en el diagnóstico de la enfermedad (por una media de 7,5 años) que aquellos que no producían ($p = 0,01$; Figura 4), sugiriendo por tanto que esta cualidad de respuesta está asociada a un inicio de enfermedad tardío, indicando un efecto protector de la producción de IL-10.

50 En resumen, los inventores identificaron por primera vez una serie de péptidos que son las dianas de linfocitos Tr1 de origen natural. Los linfocitos Tr1 están claramente asociados a dos condiciones. La primera es el estado sano no diabético. La segunda es un inicio tardío o lento de la enfermedad. Estos resultados ligan fuertemente estos linfocitos Tr1 a la protección del desarrollo de diabetes. A este respecto, los péptidos que son dianas de linfocitos Tr1 muestran propiedades ideales para uso en un entorno inmunoterapéutico peptídico.

55 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el uso de series novedosas de etapas de selección descritas anteriormente e ilustradas esquemáticamente en la Figura 5 ha posibilitado determinar las secuencias de péptidos y combinaciones de péptidos cruciales eficaces para el control terapéutico o profiláctico de T1DM. Son tres de dichos péptidos los que tienen las siguientes secuencias:

GGGPGAGSLQPLALEGSLQK (SEQ ID NO: 4),
GSLQPLALEGSLQKRGIV (SEQ ID NO: 5),

y QPLALEGSLQKRGIVEQ (SEQ ID NO: 6)

de los cuales el que tiene la secuencia GSLQPLALEGSLQKRGIV (SEQ ID NO: 5) es altamente preferido. Está también comprendido en la presente invención un péptido que contiene el siguiente consenso de las tres secuencias anteriores:

5 GGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQ (SEQ ID NO: 10).

Resulta evidente que es una secuencia componente esencial de los péptidos anteriores la secuencia:

QPLALEGSLQK (SEQ ID NO: 9),

10 dicha secuencia se extiende en uno o ambos extremos de la misma en los péptidos definidos anteriormente. Por lo tanto, la presente invención comprende un péptido que tiene una secuencia que comprende o consiste en QPLALEGSLQK (SEQ ID NO: 9).

15 Como se indica en la Tabla 1, los péptidos para uso según la presente invención son componentes de la molécula de preproinsulina. No se ha atribuido anteriormente actividad terapéutica a estos péptidos novedosos separados de secuencias con las que están asociados en la preproinsulina. De forma similar, no se ha descubierto hasta ahora actividad terapéutica para péptidos que tienen otras subsecuencias de la molécula de preproinsulina para las que se han dado a conocer propiedades inmunogénicas, incluyendo secuencias descritas por Congia *et al.* basadas únicamente en experimentos en ratones (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol 95: 3833-3838). En particular, debería observarse que no hay acuerdo entre los especialistas en la materia en cuanto a cuáles componentes peptídicos de la preproinsulina son péptidos inmunodominantes. En estas circunstancias, no ha habido una indicación anterior clara ni sugerencia de actividad terapéutica asociada a péptidos que tienen dichas subsecuencias dadas a conocer anteriormente. En contraposición, los péptidos de la presente invención se ha demostrado que tienen actividad terapéutica o preventiva especialmente con relación a T1DM. Estos péptidos son especialmente útiles para el tratamiento de pacientes que tienen el alelo HLA-DR4.

25 La distinción de los péptidos de la invención de aquellos que tienen secuencias más largas como aparecen en la naturaleza puede expresarse por el término péptidos "aislados o purificados" (por ejemplo, en los sentidos usados en el documento US 6.562.943 B1), aunque se entenderá que para el uso práctico estos péptidos se sintetizarán y producirán preferiblemente para la memoria descriptiva de acuerdo con los requisitos reguladores. Los péptidos dentro del alcance de la presente invención pueden describirse también en términos generales como péptidos consistentes esencialmente en al menos una de las secuencias SEQ ID N° 4, 5, 6, 9 y 10.

30 Están también incluidas dentro del ámbito de la presente invención otras posibles extensiones de la secuencia SEQ ID NO :9, junto con extensiones menores de los péptidos de SEQ ID N° 4, 5, 6 y 10. Los péptidos extendidos de esta clase que retienen el potencial terapéutico de los péptidos de SEQ ID N° 4, 5, 6, 9 y 10 pueden seleccionarse fácilmente mediante aplicación de los criterios de selección 1.2 y 1.3 descritos anteriormente.

35 Para uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de T1DM, al menos uno de los péptidos anteriores será el componente primario de la composición farmacéutica suministrada para dicho uso. Pueden usarse si se desea diversas combinaciones de dos o más de estos péptidos.

La presente invención comprende también una o más de las secuencias anteriores en combinación con uno o más péptidos de IA-2 que se ha encontrado ahora que exhiben una buena sinergia con el péptido de preproinsulina C19-A3 (SEQ ID NO 5). Estos se muestran en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Péptidos de IA-2 eluidos a partir de HLA-DR4 que tienen sinergia con 75-92 de preproinsulina

| Numeración en IA-2 | Secuencia |
|--------------------|---|
| 709-36 | LAKWQALCAYQAEPNTCATAQGGEGNIK (SEQ ID NO: 11) |
| 752-75 | KLKVESSPSRSDYINASPIIEHDP (SEQ ID NO: 12) |
| 853-72 | SFYLKNVQTQETRRLTQFHF (SEQ ID NO: 13) |

40 Se apreciará a partir de la descripción anterior que la selección de los péptidos o combinaciones de péptidos anteriores es el resultado de una metodología que es también novedosa y que puede usarse para determinar otros posibles péptidos asociados a T1DM y combinaciones que se probarán eficaces en el tratamiento o control de T1DM. Por ejemplo, la metodología novedosa es aplicable a la selección de péptidos o combinaciones de péptidos que comprenden péptidos derivados de preproinsulina y derivados de IA-2 eluidos a partir de HLA-DR3, HLA-DQ8 y HLA-DQ2 y ácido glutámico descarboxilasa (GAD)65, eluidos a partir de HLA-DR4, HLA-DR3, HLA-DQ8 y HLA-DQ2.

Además, esta metodología es de una aplicabilidad tan amplia que permite la extensión a la búsqueda y selección de péptidos o combinaciones de péptidos terapéuticamente valiosos derivados de autoantígenos ligados a otras enfermedades autoinmunitarias además de T1DM. Por tanto, como se aplica en el ejemplo de T1DM descrito con detalle en la presente memoria, el procedimiento empezará con la elución de los péptidos mantenida en el correspondiente complejo de MHC de clase II y proseguirá con las etapas de selección y criterios correspondientes a los descritos en la presente memoria (1.1, 1.2, y 1.3 anteriores). Los ejemplos de dichos otros autoantígenos y sus enfermedades en las que es aplicable esta metodología incluyen:

1. Con relación a esclerosis múltiple, la elución de péptidos derivados de (i) proteína básica de mielina o (ii) glucoproteína oligodendrocítica de mielina o (iii) proteína proteolipídica de HLA-DR2.

2. Con relación a artritis reumatoide, la elución de péptidos derivados de (i) colágeno o (ii) proteína de unión a inmunoglobulina (BIP) o (iii) filagrina citrulinada de HLA-DR4.

Por lo tanto, en términos generales, la presente invención proporciona un procedimiento de valoración del potencial de un péptido para uso en la terapia o prevención de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende someter el péptido candidato a un primer ensayo indicativo de respuesta de linfocitos T patogénicos en sangre (u otra muestra biológica) (por ejemplo, un ELISPOT para IFN- γ) y, opcionalmente en el caso de una respuesta positiva del mismo, someter el péptido candidato a un segundo ensayo indicativo de una respuesta de linfocitos T reguladores ante el péptido (por ejemplo, un ELISPOT de IL-10). Cuando se usan ambos de dichos ensayos, el péptido que da una respuesta positiva en el segundo ensayo se seleccionará para terapia.

2. Ensayo de tolerancia: Desarrollo de un ensayo para medir la tolerancia inmunológica a células β .

Muchos o la mayoría de los individuos en riesgo que pueden tratarse para prevenir la diabetes futura no tienen síntomas. Se identifican por ser de riesgo por un análisis de sangre de autoanticuerpos y genes, como parte de un programa de cribado poblacional amplio o porque tienen un pariente cercano con diabetes. Si no tienen síntomas ni signos, no puede saberse si la terapia tiene efecto, sin tener que esperar 5-10 años para ver si desarrollan diabetes o no. En otras palabras, todo el campo de terapia de intervención en diabetes requiere marcadores vicarios de eficacia terapéutica ("ensayos de tolerancia"). Habiéndose identificado los péptidos apropiados para uso como se describe anteriormente, se ha desarrollado ahora un bioensayo que mide la tolerancia; el equilibrio de linfocitos T CD4+ patogénicos y supresores. Dicho ensayo no estaba disponible hasta ahora.

Los procedimientos usados son aquellos descritos en las secciones 1.2 y 1.3 anteriores para efectuar un ELISPOT de citocina en sangre periférica para la detección combinada de IFN- γ e IL-10.

Se representan en la Figura 3 los resultados del análisis de ensayo combinado de sangre heparinizada reciente obtenida de 25 pacientes de DM de tipo 1 blancos con HLA-DR4 y síntomas de inicio agudo, que requieren insulina desde el diagnóstico, y de 14 sujetos de control sanos no diabéticos de edad y tipo de HLA coincidentes. Para examinar la naturaleza de la relación entre las respuestas de IL-10 e IFN- γ ante péptidos de IA-2 y preproinsulina en pacientes y sujetos de control, se representó el índice de estimulación para cada citocina cuando se observaba una respuesta peptídica positiva (IE \geq 3,0 para IFN- γ o IL-10). Estos resultados demostraron una correlación inversa altamente significativa entre las respuestas representadas por cada una de estas citocinas (Figura 3; $p=0,000004$), indicando que, en el contexto de una respuesta de linfocitos T autorreactivos, hay una polarización extrema de autorreactividad proinflamatoria frente a reguladora. Además, aunque los pacientes con T1DM se agrupaban cercanos al eje y, los sujetos de control no diabéticos se distribuían a lo largo del eje x, destacando la asociación de los estados patológico y tolerante con las respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria o reguladora, respectivamente. En contraposición, no había una correlación inversa entre las respuestas de IFN- γ e IL-10 al toxoide del tétanos ($p=0,64$).

Esta tendencia a producir respuestas de linfocitos T Th1 o reguladoras polarizadas ante epítomos de IA-2 y preproinsulina procesados y presentados naturalmente proporciona una clara distinción de la calidad de autorreactividad entre pacientes de T1DM y sujetos no diabéticos ($p < 0,0001$). Por tanto, el ensayo de tolerancia que se describe, cuando se representa como en la Figura 3, indica que la combinación de los péptidos seleccionados y un ensayo que mide las respuestas de IFN- γ e IL-10 puede discriminar pacientes y sujetos de control en 3 amplias categorías. La categoría 1, a lo largo del eje x (IL-10, pero no IFN- γ), es el estado sano no diabético. La categoría 2, a lo largo del eje y (IFN- γ , pero no IL-10) es el estado patológico. La categoría 3, en el cuadrante superior derecho (IFN- γ e IL-10) es el estado patológico progresivo lentamente. Este enfoque novedoso identifica las respuestas en las categorías 1 y 3 por representar grados mensurables de tolerancia. Se predecirá que los pacientes con inicio reciente o prediabéticos, que experimentan inmunoterapia y en que se mide la tolerancia usando este ensayo, se desplacen de la categoría 2 a la derecha y abajo (se hace referencia a la Figura 3 para el lector), como indicación de inducción de tolerancia y efecto del tratamiento.

Tabla 4. Prevalencia de respuestas de IL-10 ante péptidos de IA-2 y PI en pacientes de T1DM y sujetos de control no diabéticos

| | Respuestas ante secuencias de péptidos de IA-2 (IE) | | | | | | Respuestas ante secuencias de péptidos de preproinsulina (IE) | | |
|---|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|-------------|-------------|
| | 652-80 | 709-36 | 752-75 | 793-817 | 853-72 | 955-76 | C13-32 | C19-A3 | C22-A5 |
| Pacientes de T1DM con alelos de HLA- DR4 | | | | | | | | | |
| #2 | 4/17 | | 1/17 | 3/17 | | 1/17 | 1/12 | 1/12 | 1/12 |
| #3 | 4/17 | | 1/17 | 3/17 | | 1/17 | 1/12 | 1/12 | 1/12 |
| #4 | | | | | | | | | |
| #5 | | 3/17 | | | | | | | |
| #6 | | | | | 2/17 | | | | |
| #7 | | | | | | | | | |
| #11 | | | | | | | | | |
| #12 | | | 2/17 | | | | | | |
| #13 | | | | | | | | | |
| #15 | | | | | | | | | |
| #18 | | | | | | | | | |
| #19 | | | | | | | | | |
| #20 | | | | | | | - | - | - |
| #21 | | | | | | | - | - | - |
| #23 | | | | | | | - | - | - |
| #24 | 2/17 | 2/17 | 1/17 | | 1/17 | 2/17 | - | - | - |
| #25 | | | | | | | - | - | - |
| Totales | 2/17 | 2/17 | 3/17 | 1/17 | 2/17 | 2/17 | 1/12 | 1/12 | 1/12 |
| (%) | (12) | (12) | (18) | (6) | (18) | (6) | (8) | (8) | (8) |
| Pacientes de T1DM con alelos no DR4 | | | | | | | | | |
| #26 | | | | | | | | | |
| #27 | | 2/17 | 3/17 | 4/17 | 2/17 | 1/17 | | 1/12 | 1/12 |
| #28 | | | | | | | 1/12 | | |
| #29 | | | | | | | | | |
| #33 | | | | | | | | 2/12 | |
| #35 | 1/17 | | 1/17 | | 1/17 | | - | - | - |
| #36 | | | | | | | | | |
| Totales | 1/7 | 1/7 | 2/7 | 1/7 | 2/7 | 1/7 | 1/5 | 2/5 | 1/5 |
| (%) | (14) | (14) | (29) | (14) | (29) | (14) | (20) | (40) | (20) |
| Sujetos de control no diabéticos | | | | | | | | | |
| C1 | | | | | | | | | |
| C2 | | | | | | | | | |
| C3 | | | 1/14 | | | | | | |
| C4 | 1/14 | 3/14 | | 2/14 | | 1/14 | | | |
| C5 | | | | | | | | 1/13 | |
| C6 | | 1/14 | | | | | | | |
| C7 | | | | | | | | | |
| C8 | 1/14 | | 1/14 | | 1/14 | 1/14 | | 1/13 | |
| C9 | 1/14 | | | | | | | | |
| C10 | 1/14 | | | | | | | | |
| C11 | | | | | | 1/14 | | | |
| C12 | | | | | | | | | |
| C13 | 1/14 | | 1/14 | | | | 1/13 | 1/13 | 1/13 |
| C14 | | | | | | | | | |
| Totales | 4/14 | 3/14 | 2/14 | 2/14 | 2/14 | 3/14 | 1/13 | 3/13 | 1/13 |
| (%) | (29) | (21) | (14) | (14) | (14) | (21) | (8) | (23) | (8) |

5 -: no realizado. IE: índice de estimulación; véanse los procedimientos para detalles, los números en cuadros sombreados indican IE.

(1) Terapia específica para diabetes de tipo 1

10 Los inventores han realizado un descubrimiento que proporciona un fuerte apoyo a la exploración de esta estrategia novedosa. Cuando se analizan los PBMC de pacientes con diabetes de tipo 1 ante péptidos de preproinsulina e IA-2, se identificaron estos péptidos como dianas de un subconjunto de linfocitos T reguladores. Estos linfocitos Tr1 se encontraron en pacientes con enfermedad progresiva lentamente. Esto proporciona una evidencia *in vivo* de que los linfocitos Tr1 que reconocen los péptidos de preproinsulina e IA-2 tienen propiedades reguladoras y tolerogénicas.

Puesto que los linfocitos Tr1 que reconocen estos péptidos pueden inducirse por inmunoterapia peptídica, se propone el uso terapéutico de péptidos de preproinsulina e IA-2 en la prevención de la diabetes.

La estrategia de inmunoterapia peptídica de los inventores es el uso de inyección peptídica, o procedimientos relacionados, para inducir *in vivo* poblaciones reguladoras de linfocitos T (linfocitos Tr1) que reconocen el mismo péptido que los linfocitos patogénicos efectos equivalentes (estos linfocitos producen IFN- γ y se llaman Th1). La inmunoterapia peptídica es particularmente potente en la inducción de linfocitos Tr1 que sintetizan el mediador químico inmunosupresor IL-10. En estas circunstancias, cuando uno de los péptidos de preproinsulina e IA-2 se presenta por una célula presentadora de antígeno en el páncreas o nódulos linfáticos locales de un paciente que desarrolla diabetes, el péptido se reconoce simultáneamente por linfocitos Th1 y Tr1. Es conocido que, en estas circunstancias, el linfocito Tr1 es dominante y ejerce una "supresión circunstancial" frente a la respuesta de Th1.

La identificación de una combinación específica de péptidos que identifica linfocitos T CD4+ patogénicos en la mayoría de pacientes conduce a una terapia en la que los linfocitos T CD4+ implicados en la T1DM se inactivan, restaurando la tolerancia a células β a largo plazo. Es un elemento importante de este enfoque la demostración de que la combinación de 4 epítomos de 2 autoantígenos es excepcional en términos de cobertura de las respuestas de linfocitos T CD4+ patogénicos. Dicha cobertura da una mayor potencia a la terapia y aplicabilidad a un mayor intervalo de pacientes que cualquier monoterapia propuesta hasta ahora. Por tanto, este enfoque terapéutico los inventores es inmunoterapia peptídica multiepitópica multiantigénica y usa los péptidos que se han identificado mediante una combinación de elución y bioensayo.

Es un ejemplo de un aspecto de la invención como sigue. Se sintetizan los péptidos seleccionados hasta pureza de GMP y se combinan para representar las mejores eficacias combinadas posibles. Se usan los péptidos individualmente o combinados en viales que contienen hasta aproximadamente 1 mg de cada péptido por dosis individual, por ejemplo, de 0,5 a 5 a 50 a 250 o hasta 500 μ g en disolución salina estéril, y se administran los contenidos del vial. En general, y como se usa en este ejemplo, la administración puede ser por vías parenteral u oral o tópica, incluyendo inyección intradérmica, subcutánea o intravenosa, o por vía nasal u oral o epicutánea como disoluciones sencillas. Los péptidos pueden administrarse también junto con coadyuvantes promotores de tolerancia o células promotoras de tolerancia. Los coadyuvantes promotores de tolerancia incluyen IL-10 y la subunidad B de toxina del cólera recombinante (rCTB), que se administran conjuntamente con el péptido. Las células promotoras de tolerancia incluyen células dendríticas inmaduras y células dendríticas tratadas con vitamina D3, (1- α ,25-dihidroxitamina D3) o sus análogos. En este ejemplo, se propagan células dendríticas inmaduras de sangre de paciente *in vitro* usando técnicas estándares antes del comienzo de la terapia. Se unen entonces los péptidos a las células dendríticas *in vitro* antes de la administración, que puede ser mediante cualquiera de las vías parenterales mencionadas anteriormente. En este ejemplo, la administración de péptido en cualquiera de estas formas tiene lugar en 3 ocasiones a intervalos de 0, 1 y 2 meses.

En este ejemplo, el tratamiento puede continuarse según la indicación de medidas del objetivo primario. Las medidas del objetivo primario son un cambio inducido por péptido de las células IL-10+ (aumento) e IFN- γ + (reducción) reactivas con péptido detectado por el ensayo ELISPOT de citocina o cambios similares en células IL-10+ e IFN- γ + reactivas con epítomos de preproinsulina e IA-2 que no se habían tratado (concretamente, los llamados efectos circunstanciales). Las medidas del objetivo primario adicionales serán cambios en los niveles de péptido C basal y estimulado a los 3, 6 y 12 meses después de iniciar el tratamiento y cambios en la dosificación de insulina y HbA1c frente a placebo, cada uno de los cuales representa la potenciación de la producción de insulina endógena. Cualquiera de dichas medidas del objetivo primario favorable impondrá el cese de la terapia; a la inversa, la continuación de la presencia o reaparición de, por ejemplo, linfocitos IFN- γ + que reconocen los péptidos terapéuticos, impondrá la continuación de la terapia.

En este ejemplo, los sujetos para terapia son individuos identificados por estar en riesgo de desarrollo de diabetes en los próximos 5-10 años por la presencia de autoanticuerpos en circulación. Los autoanticuerpos usados para esta identificación son aquellos contra preproinsulina, IA-2 y GAD65 y también un autoanticuerpo denominado anticuerpo de células de islote (ICA). Todos los sujetos tendrán al menos una molécula de HLA de alto riesgo, por ejemplo, HLA-DR4, -DR3, -DQ8, -DQ2. Los sujetos pueden ser también sujetos recién diagnosticados con diabetes de tipo 1, a los 3 meses del diagnóstico y con al menos un autoanticuerpo en circulación como se especifica anteriormente.

(2) Ensayo de tolerancia para monitorizar la terapia de diabetes de tipo 1

También de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se describe de aquí en adelante un ensayo de tolerancia que está constituido por los péptidos más un bioensayo ELISPOT de citocina para uso en la monitorización de terapias de intervención en pacientes con, o con riesgo de, diabetes de tipo 1. La identificación de péptidos específicos y combinaciones de péptidos ha conducido a la solución de los problemas terapéuticos previos, porque los péptidos pueden usarse (a) para revelar la presencia de linfocitos T CD4+ patogénicos en pacientes y (b) para revelar la presencia de linfocitos T CD4+ supresores no patogénicos que se han inducido por terapias preventivas. Una contribución importante de los inventores es la demostración de que la combinación altamente preferida de 4 epítomos de 2 autoantígenos es ampliamente superior en términos de su cobertura de respuestas de linfocitos T CD4+ patogénicos y supresores que cualquier otro péptido anteriormente propuesto. Por tanto, el enfoque de diagnóstico de los inventores es un cribado multiepitópico multiantigénico para monitorizar el equilibrio de

respuestas inmunitarias patogénicas frente a protectoras en pacientes que experimentan intervenciones terapéuticas por diabetes de tipo 1.

5 Es un ejemplo de este enfoque como sigue. Se sintetizan péptidos que representan los epítomos que tienen las secuencias identificadas anteriormente en la presente memoria mediante química de Fmoc estándar hasta pureza de LMP y se usan individualmente o agrupados en cócteles que representan las mejores eficacias combinadas posibles. En este ejemplo, se comienza un tratamiento inmunomodulador particular con el objetivo de detener o prevenir los procesos autoinmunitarios que conducen a diabetes de tipo 1. Es un ejemplo de esta intervención un curso de tratamiento con inmunoterapia peptídica, o el anticuerpo monoclonal hOKT3 anti-CD3 no reductor dirigido contra linfocitos T o un fármaco inmunosupresor tal como rapamicina. Estas terapias se administran durante un periodo definido y se miden entonces los marcadores vicarios en un ensayo de tolerancia para valorar el efecto de la terapia sobre la autoinmunidad patogénica. Es un ejemplo de marcador vicario para usar de este modo el ELISPOT de citocina que detecta las respuestas de linfocitos T CD4+ patogénicos (IFN- γ) y supresores (IL-10) ante péptidos individuales o cócteles de péptidos identificados como se describe anteriormente. La reducción o desaparición de los linfocitos T CD4+ patogénicos, o la inducción de linfocitos T CD4+ supresores, conduciría a una reducción o cese de la terapia. Ningún cambio o un empeoramiento de estos marcadores vicarios conduciría a la continuación de la terapia y/o a la introducción de nuevos reactivos.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención comprende un procedimiento de medida del estado de tolerancia inmunológica de un paciente a células β o células implicadas en otra enfermedad autoinmunitaria que comprende las siguientes etapas:

- 20 (a) extraer las células mononucleares de sangre periférica del paciente,
- (b) cultivar estas células con cualquiera de los péptidos o combinaciones de péptidos definidos anteriormente en la presente memoria, o derivados por la metodología descrita anteriormente en la presente memoria,
- (c) aplicar un análisis de ELISPOT de citocina a las células cultivadas para cuantificar la producción celular de citocinas, por ejemplo, interferón γ e interleucina 10. La tolerancia inmunológica de los pacientes a las células se demuestra por la presencia de un número aumentado de células productoras de interleucina 10 y por un número reducido de células productoras de interferón γ .

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> King's College London
- <110> PEAKMAN, MARK
- 30 <120> Péptidos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias
- <130> IT/ED/N16513
- <150> 10/783.095
- <151> 23-02-2004
- <150> GB 0402129.1
- 35 <151> 30-01-2004
- <150> GB 0404199.2
- <151> 25-02-2004
- <160> 17
- <170> PatentIn Ver. 3.2
- 40 <210> 1
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 432 441 T3

<400> 1

Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val
1 5 10 15

Glu Leu Gly Gly Gly Pro
20

<210> 2

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu
20

10

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 3

Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly
1 5 10 15

Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
20

<210> 4

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 4

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Lys
 20

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 5

Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 1 5 10 15

Ile Val

10 <210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 6

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
 1 5 10 15

Gln

<210> 7

<211> 21

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 7

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 1 5 10 15

Thr Ser Ile Cys Ser
 20

25 <210> 8

<211> 8

ES 2 432 441 T3

<211> 86
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido de proinsulina sintético
 <400> 8

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 9

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
1 5 10

15 <210> 10
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido de consenso
 <400> 10

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
 20 25

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11

Leu Ala Lys Glu Trp Gln Ala Leu Cys Ala Tyr Gln Ala Glu Pro Asn
 1 5 10 15

Thr Cys Ala Thr Ala Gln Gly Glu Gly Asn Ile Lys
 20 25

10 <210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 12

Lys Leu Lys Val Glu Ser Ser Pro Ser Arg Ser Asp Tyr Ile Asn Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Ile Ile Glu His Asp Pro
 20

<210> 13

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 13

Ser Phe Tyr Leu Lys Asn Val Gln Thr Gln Glu Thr Arg Thr Leu Thr
1 5 10 15

Gln Phe His Phe
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 14

Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu
1 5 10 15

Leu Met Gln Ala
20

10 <210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 15

Leu Leu Glu Ser Gln Ile Ala Thr Ile Glu Gln Ser Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Asp Gln Glu Gln
20

<210> 16

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16

Ala Gly Lys Ser Val Ala Thr Asn Leu Ile Gly Arg Ser Leu Ala Glu
1 5 10 15

Lys Leu Asn Ser Ser Val
20

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 17

Cys Gln Met Val Ser Ser Val Asp Phe Val Pro Pro Met Ala Ala Leu
1 5 10 15

Glu Glu Lys Gly Ile Leu Phe
20

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que consiste en la secuencia GGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQ (SEQ ID NO: 10), o un fragmento del mismo, consistiendo dicho fragmento en GGGPGAGSLQPLALEGSLQK (SEQ ID NO: 4), GSLQPLALEGSLQKRGIV (SEQ ID NO: 5), QPLALEGSLQKRGIVEQ (SEQ ID NO: 6) o QPLALEGSLQK (SEQ ID NO: 9).
- 10 2. Una composición que comprende un primer péptido según la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente dicha composición un péptido o péptidos que tienen una secuencia o secuencias seleccionadas del grupo que consiste en
 - a. 752-75 de IA-2 (SEQ ID NO: 12);
 - 10 b. 853-72 de IA-2 (SEQ ID NO: 13);
 - c. 709-36 de IA-2 (SEQ ID NO: 11);
 - d. 752-75 de IA-2 (SEQ ID NO: 12) y 853-72 de IA-2 (SEQ ID NO: 13);
 - e. 709-36 de IA-2 (SEQ ID NO: 11) y 752-75 de IA-2 (SEQ ID NO: 12);
 - f. 709-36 de IA-2 (SEQ ID NO: 11) y 853-72 de IA-2 (SEQ ID NO: 13); y
 - 15 g. 709-36 de IA-2 (SEQ ID NO: 11) y 752-75 de IA-2 (SEQ ID NO: 12) y 853-72 de IA-2 (SEQ ID NO: 13).
3. Una composición según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento terapéutico o preventivo de diabetes sacarina de tipo 1 (T1DM).
4. Un péptido o composición según cualquier reivindicación precedente, en que el péptido o cada péptido se conjuga o combina de otro modo con un coadyuvante promotor de tolerancia o células promotoras de tolerancia.
- 20 5. Un péptido o composición según cualquier reivindicación precedente, en que el péptido o cada péptido se conjuga o combina de otro modo con células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno.
6. Un péptido o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es adecuado para administración por vía parenteral o tópica oral, incluyendo inyección intradérmica, subcutánea o intravenosa, o por vía nasal o epicutánea.
- 25 7. Un péptido según la reivindicación 1 para su uso en la terapia o la profilaxis de diabetes sacarina de tipo 1 (T1DM).
8. Un procedimiento de medida del estado de tolerancia inmunológica de un paciente a células β u otras células afectadas por, o implicadas en, diabetes sacarina de tipo 1, que comprende las siguientes etapas:
 - 30 a. Incubar las células mononucleares de sangre periférica del paciente *in vitro* con cualquiera de los péptidos o composiciones definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 - b. aplicar un análisis ELISPOT de citocina a las células incubadas para cuantificar la producción celular de interferón γ e interleucina 10, en el que la tolerancia inmunológica del paciente a células β se demuestra por la presencia de un número aumentado de células productoras de interleucina 10 y un número reducido de células productoras de interferón γ , en comparación con las presentes antes del tratamiento.
- 35 9. El uso de cualquier péptido o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para la terapia o prevención de diabetes de tipo 1.
- 40 10. Un procedimiento para valorar el potencial de un péptido para su uso en la terapia o prevención de diabetes de tipo 1, que comprende someter al péptido candidato a un primer ensayo ELISPOT para IFN- γ indicativo de una respuesta de linfocitos T patogénicos en la sangre, en el que, en el caso de una respuesta positiva al primer ensayo, se somete el péptido candidato a un segundo ensayo ELISPOT para IL-10 indicativo de una respuesta de linfocitos T reguladores ante el péptido.

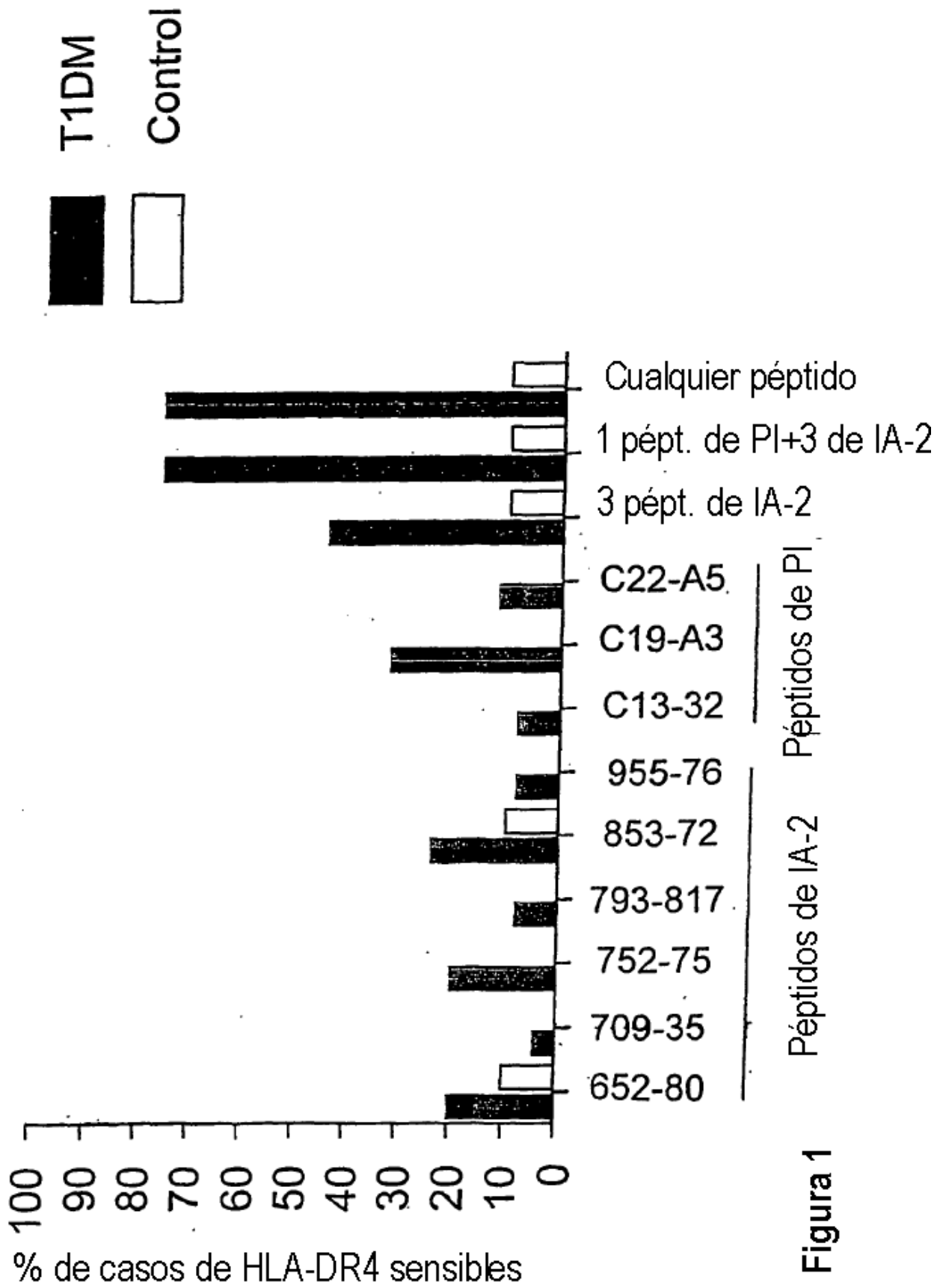
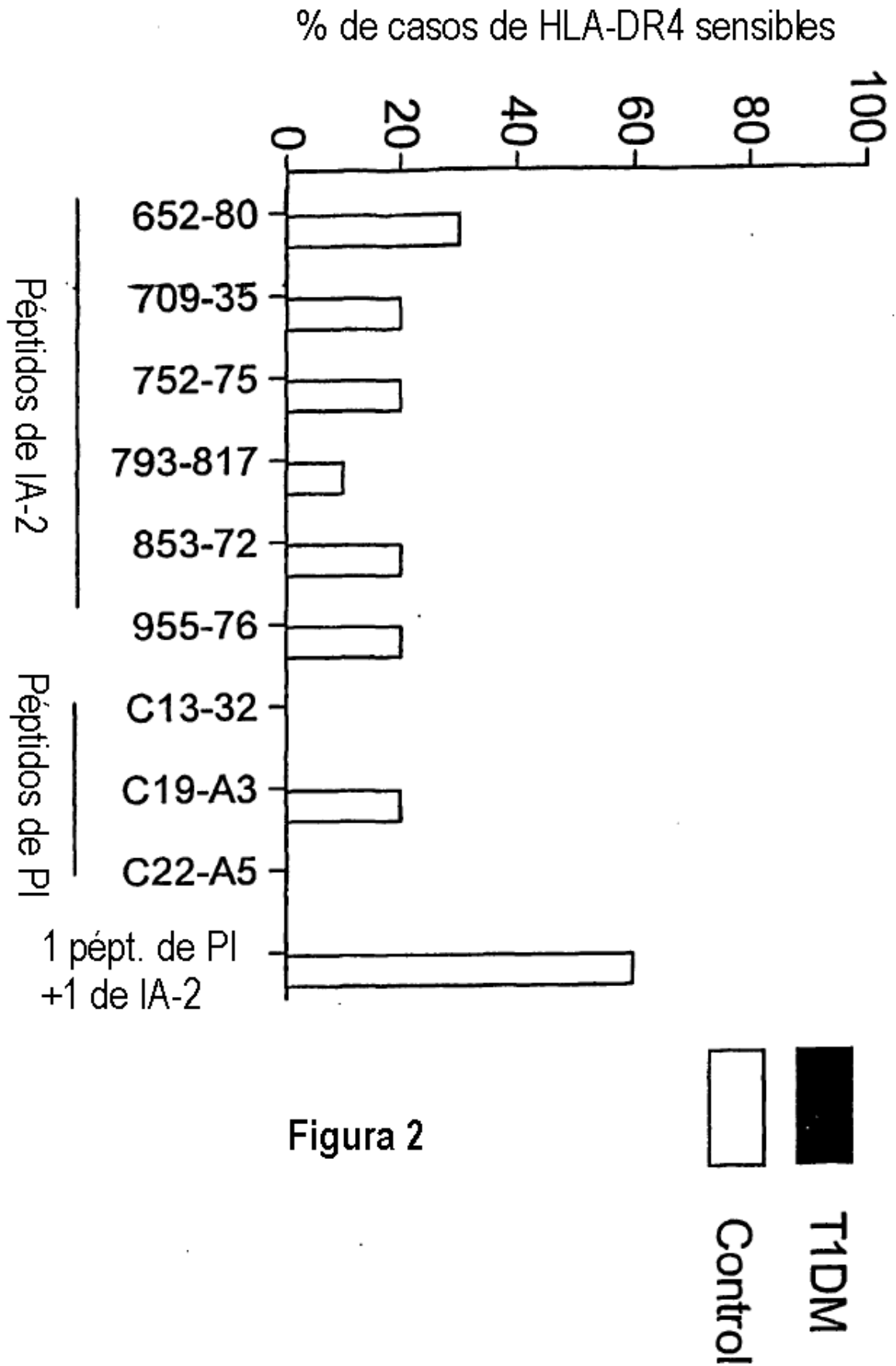


Figura 1



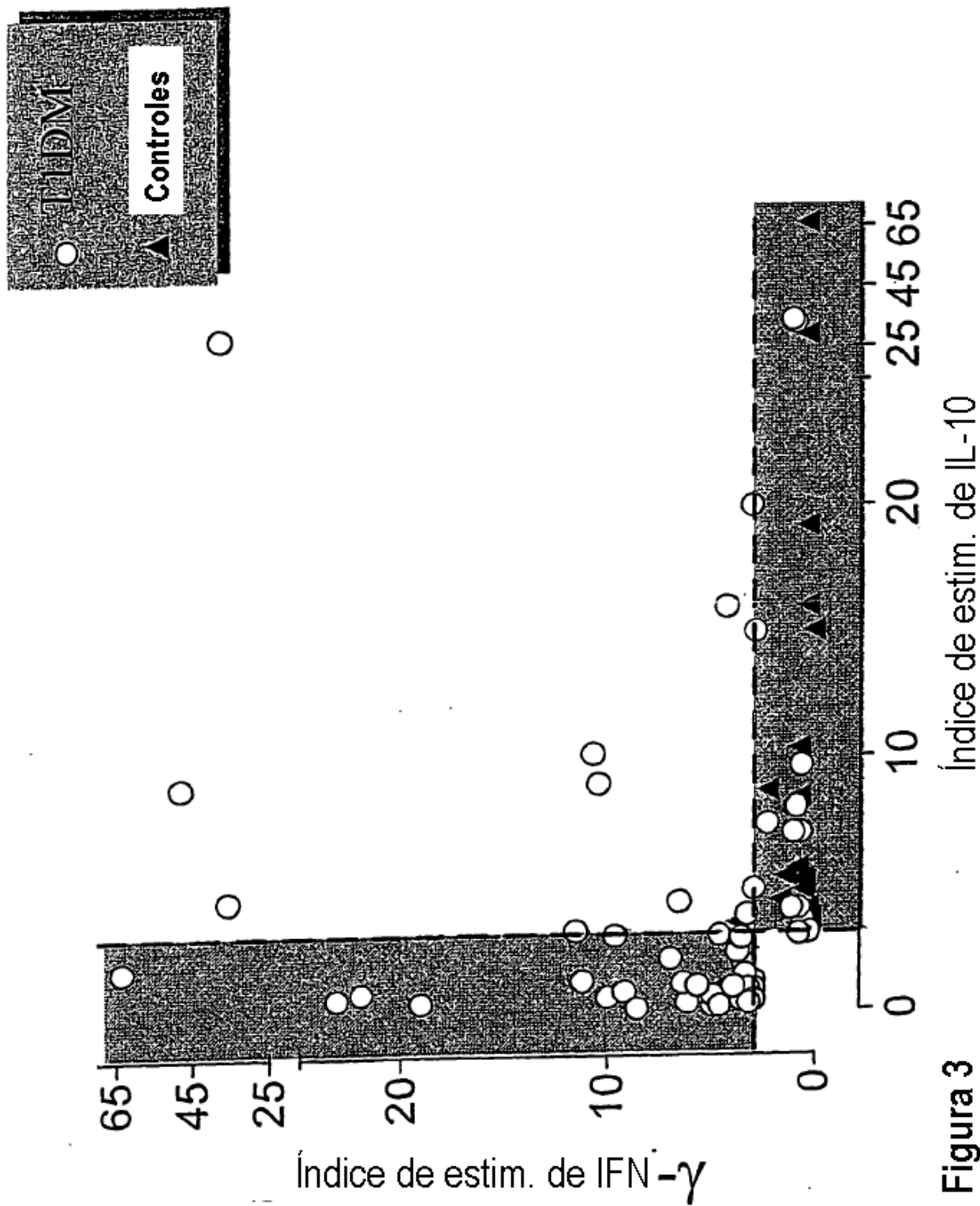


Figura 3

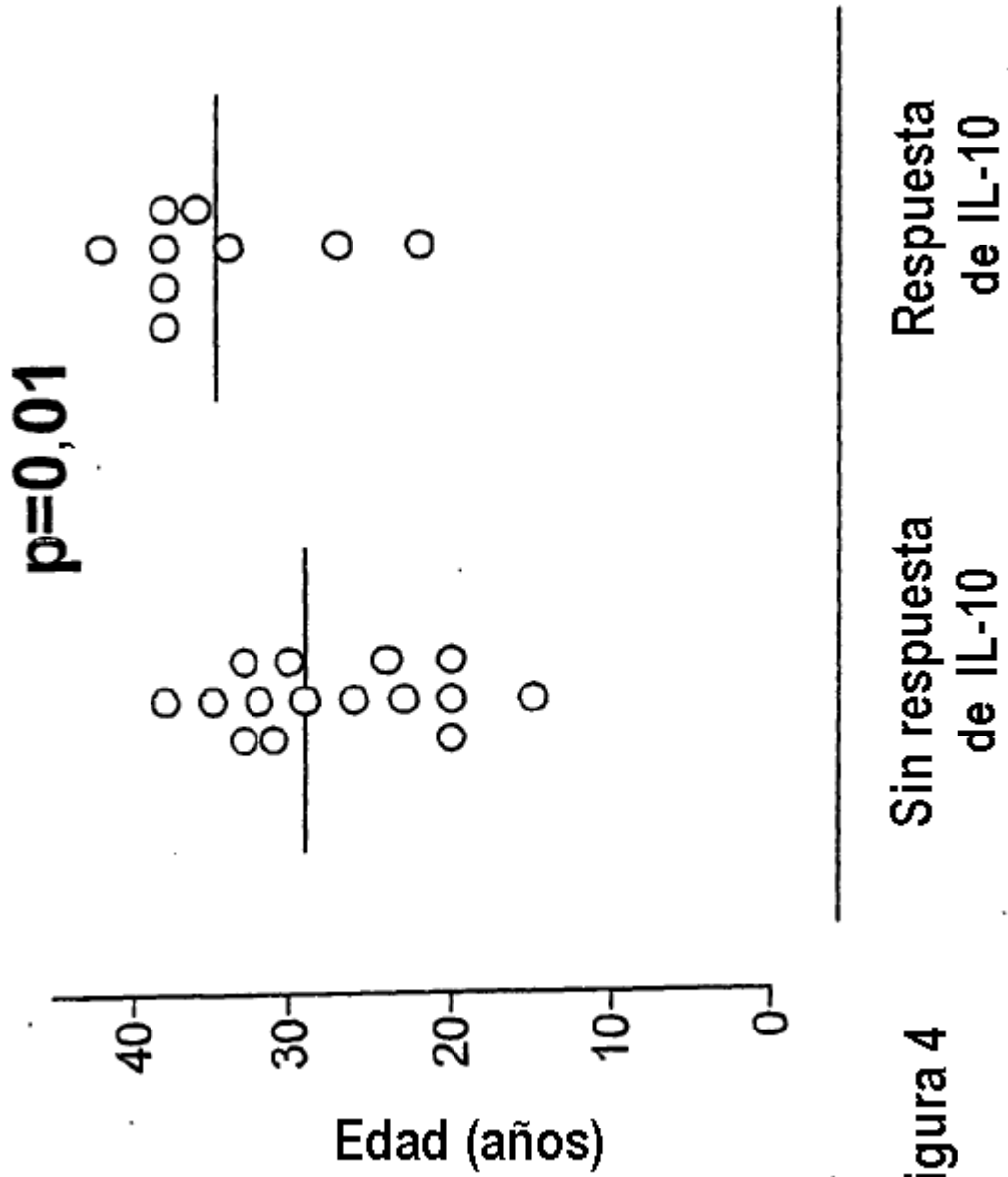


Figura 4

Estrategia para la invención de inmunoterapia peptídica de preproinsulina

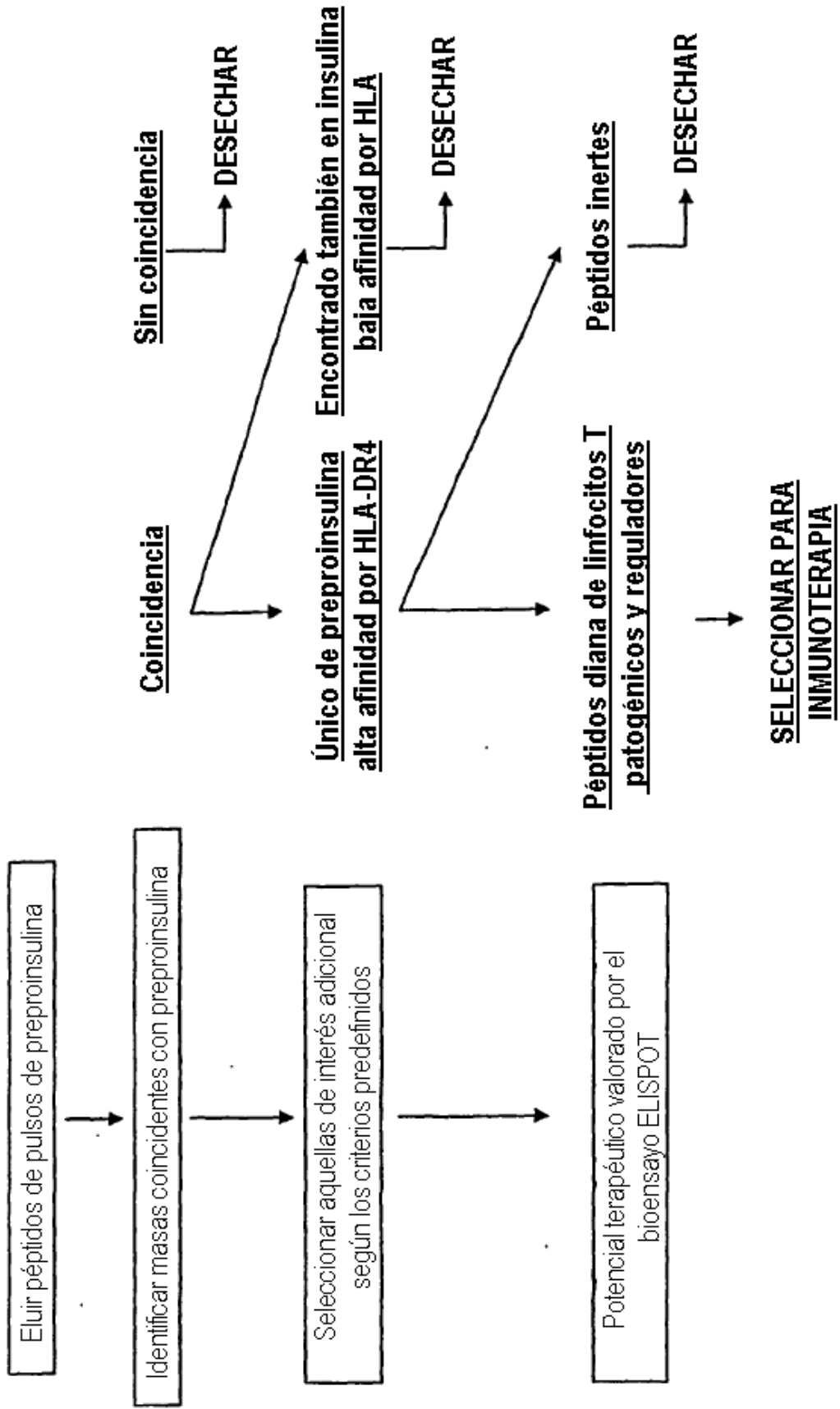


Figura 5