

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 899**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2001 E 06014901 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1731912**

54 Título: **Método de selección de péptidos**

30 Prioridad:

**21.08.2000 GB 0020618**  
**14.06.2001 GB 0114547**

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

**27.01.2014**

73 Titular/es:

**APIPOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED**  
**(100.0%)**  
**Bristol & Bath Science Park, Dirac Crescent**  
**Emersons Green BS16 7FR, GB**

72 Inventor/es:

**WRAITH, DAVID CAMERON;**  
**ANDERTON, STEPHEN MARK;**  
**MAZZA, GRAZIELLA;**  
**PONSFORD, MARY y**  
**STREETER, HEATHER BARBARA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 439 899 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

Método de selección de péptidos

- 5 La presente invención se refiere a un método para seleccionar un péptido tolerogénico, péptido que puede ser útil en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

**Antecedentes**

- 10 En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T pueden reconocer epítomos internos de un antígeno proteico. Las células presentadoras de antígeno (APC) toman antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido puede unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II dentro de la célula y llevarse hasta la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular junto con una molécula del MHC, el péptido puede reconocerse por una célula T (por medio del receptor de células T (TCR)), en cuyo caso el péptido es un epítomo de célula T.

- 15 Los epítomos de células T desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria adaptativa frente a cualquier antígeno, ya sea propio o extraño. El papel fundamental desempeñado por los epítomos de células T en enfermedades de hipersensibilidad (que incluyen alergia, enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplante) se ha demostrado a través de la utilización de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de epítomos de células T) en combinación con un adyuvante.

- 20 Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir tolerancia inmunológica frente a epítomos peptídicos particulares mediante la administración de epítomos peptídicos en forma soluble. Se ha demostrado que la administración de antígenos peptídicos solubles es un medio eficaz para inhibir la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE - un modelo para la esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith (1993) Int. Immunol. 5:1159-1165; Liu y Wraith (1995) Int. Immunol. 7:1255-1263; Anderton y Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes y uveorretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) tal como anteriormente). También se ha demostrado que esto es un medio para tratar una enfermedad en curso en EAE (Anderton y Wraith (1998) tal como anteriormente).

- 25 La utilización de péptidos tolerogénicos para tratar o prevenir la enfermedad ha atraído una atención considerable. Una razón para esto es que se ha demostrado que ciertos epítomos tolerogénicos pueden regular por disminución respuestas de células T para distintos antígenos dentro del mismo tejido. Este fenómeno, conocido como "supresión transeúnte" significa que debería ser posible inducir tolerancia a más de un epítomo (preferentemente todos los epítomos) dentro de un antígeno dado y a más de un antígeno para una enfermedad dada, utilizando un péptido tolerogénico particular (Anderton y Wraith (1998) tal como anteriormente). Esto obviaría la necesidad de identificar todos los antígenos patógenos dentro de una enfermedad particular.

- 30 Los péptidos son también una opción favorable para el tratamiento debido a su coste relativamente bajo y al hecho de que pueden producirse análogos peptídicos con propiedades inmunológicas alteradas. Los péptidos pueden modificarse por tanto para alterar sus interacciones o bien con MHC o TCR.

- 35 Un posible problema de este enfoque es que se ha demostrado que no todos los péptidos que actúan como epítomos de células T pueden inducir tolerancia. El péptido 89-101 proteína básica de la mielina (MBP) es un antígeno inmunodominante tras la inmunización y es también un inmunógeno muy eficaz en cuanto tanto a la sensibilización para la reactividad de células T como a la inducción de EAE. Sin embargo, se ha demostrado que este péptido es ineficaz para inducir tolerancia cuando se administra en disolución (Anderton y Wraith (1998), tal como anteriormente).

- 40 Se han propuesto varias explicaciones para la jerarquía observada en la capacidad de los epítomos de células T para inducir tolerancia (revisado en Anderton y Wraith (1998) tal como anteriormente). En particular, se ha propuesto que existe una correlación entre la afinidad del péptido por el MHC y tolerogenicidad (Liu y Wraith (1995) tal como anteriormente), pero esto no concuerda con algunas de las observaciones. Por ejemplo, MBP [89-101], que no es tolerogénica, se une a I-A<sup>S</sup> con una afinidad relativamente alta. Por tanto no es sencillo predecir qué péptidos inducirán tolerancia.

- 45 Wicker *et al.* (1996) J. Clin. Invest. 98:2597-2653, divulgan un método para identificar epítomos peptídicos de unión de clase II a partir de antígenos relacionados con enfermedades autoinmunitarias en el desarrollo de terapia de modulación inmunitaria específica de antígeno.

- 50 Fairchild *et al.* (1996), International Immunity, 8:1035-1043, describen el uso de un sistema de presentación de antígenos libre de transformación para investigar el efecto de incrementar longitud peptídica por encima del epítomo de células T mínimo.

Si existiera una explicación de porqué solamente una proporción de los epítomos peptídicos pueden inducir tolerancia, esto facilitaría la selección de péptidos tolerogénicos útiles en el tratamiento y la prevención de trastornos de hipersensibilidad.

5 **Sumario de la invención**

10 Los autores de la presente invención han demostrado que si un epítomo peptídico presenta un tamaño apropiado para presentarse por APC inmaduras sin transformación antigénica, ello puede inducir tolerancia inmunológica. La observación de que algunos epítomos de células T son tolerogénicos y otros no pueden inducir tolerancia puede explicarse por tanto por el hecho de que algunos epítomos requieren transformación adicional antes de que puedan presentarse por una molécula del MHC. Estos epítomos que requieren transformación adicional no inducen tolerancia cuando se administran en una forma soluble, a pesar de su capacidad para inducir enfermedad cuando se inyectan en combinación con adyuvante.

15 Los epítomos que no requieren transformación adicional pueden inducir tolerancia y se han denominado "apítomos" (Antigen Processing Independent epiTOPES) en la presente invención.

20 Este hallazgo proporciona un método basado en las reglas para la selección de epítomos de células T tolerogénicos que obvia la necesidad de examinar la capacidad tolerogénica de un péptido *in vivo*. Esto es particularmente ventajoso en el desarrollo de estrategias para tratar o prevenir enfermedades para las que no hay disponible ningún modelo animal. Incluso para enfermedades que presentan un modelo animal, el método de selección debería hacer más sencillo y seguro el desarrollo de composiciones de inducción de tolerancia, debido a que proporciona un mecanismo mediante el que la capacidad de inducción de tolerancia de un péptido puede someterse a prueba en células T humanas (antígeno de reconocimiento junto con moléculas del MHC humanas) *in vitro*, antes de su utilización *in vivo*.

30 En un primer aspecto, por lo tanto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para seleccionar un péptido que sea útil en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno de hipersensibilidad mediado por células T que reconozca el antígeno objetivo, que comprende las siguientes etapas:

(i) tratar un sistema de presentación de antígenos libre de transformación con una pluralidad de péptidos comprendiendo cada uno un epítomo de células T del antígeno diana;

35 (ii) analizar unión de los péptidos a moléculas del MHC de clase I o de clase II en el sistema añadiendo células T y midiendo activación de células T;

40 (iii) identificar un péptido que es capaz de unir una molécula del MHC de clase I o de clase II en el sistema de presentación de antígenos libre de transformación y que se presenta a una célula T como siendo un péptido capaz de inducir tolerancia al antígeno diana *in vivo* cuando se administra a un sujeto, que es útil en la prevención y/o el tratamiento del trastorno de hipersensibilidad; y

45 (iv) seleccionar un péptido que se identifica como que es capaz de unir una molécula del MHC de clase I o de clase II en el sistema de presentación de antígenos libre de transformación y que se presenta a una célula T en la etapa (iii).

En una realización preferida, el método comprende la etapa de investigar si el péptido es capaz de unión a una molécula del MHC de clase II en el sistema de presentación de antígenos libre de transformación y de presentación a una célula T.

50 El péptido seleccionado por el método de la invención puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad. En particular, el péptido puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que está mediada por células T autorreactivas. Las reacciones de hipersensibilidad son particularmente flexibles a tratamiento/prevención utilizando el péptido de la presente invención, por ejemplo alergia, autoinmunidad y rechazo de trasplantes.

55 Los autores de la presente invención han identificado ya un número de apítomos para la proteína básica de mielina, que es un autoantígeno en la esclerosis múltiple. En una realización especialmente preferida, por lo tanto, los péptidos seleccionados por el método de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o prevención de la esclerosis múltiple.

60 Se sabe que algunos péptidos son capaces de inducir tolerancia a otros epítomos a partir del mismo antígeno e incluso a otros epítomos a partir de un antígeno distinto (mediante el fenómeno conocido como supresión transeúnte). Sin embargo, los autores de la presente invención predicen que con el fin de suprimir de manera adecuada todas las células T autorreactivas, sería ventajoso que se administrara una combinación de diversos apítomos al paciente para tratar/prevenir una enfermedad particular. Una pluralidad de péptidos se puede usar así en la composición farmacéutica, basándose cada péptido en un epítomo de células T.

Un péptido seleccionado mediante el método de la presente invención se puede usar en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto.

5 Una estrategia general para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto puede comprender las siguientes etapas:

(i) identificar un antígeno para la enfermedad;

10 (ii) identificar un apítopo para el antígeno; y

(iii) administrar el apítopo al sujeto.

**Breve descripción de las figuras**

15 La figura 1 muestra un ejemplo típico del perfil cinético de derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) y MBP en pacientes con esclerosis múltiple (EM) e individuos sanos. Se someten a prueba células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas a partir de un paciente (A) con EM y un individuo (B) normal para determinar su capacidad para proliferar en presencia de PPD y MBP completa; el perfil cinético de la  
20 respuesta proliferativa frente a MBP se compara con el de PPD de antígeno secundario.

La figura 2 es una tabla que resume las respuestas de PBMC frente a MBP y sus péptidos en pacientes con EM. Se analizan ciertos individuos en tres puntos temporales separados, con un periodo de aproximadamente de 4 a 7  
25 meses entre cada punto temporal.

La figura 3 es una tabla que resume las respuestas de PBMC frente a MBP y péptidos MBP en individuos sanos. Transcurren entre 4 y 7 meses entre cada punto temporal.

30 La figura 4 muestra un ejemplo de un paciente con EM (EM 49) que responde a múltiples péptidos en 2 puntos temporales diferentes, pero para el que el perfil de reconocimiento durante el segundo punto temporal, medido 4 meses más tarde, difiere significativamente. Se cultivaron PBMC en presencia de MBP y un panel de péptidos que comprende la longitud completa de MBP y se midió la proliferación mediante la captación de 3H-timidina. La amplia respuesta proliferativa de células T observada en el primer punto temporal fue significativamente diferente a la  
35 respuesta medida 7 meses más tarde (segundo punto temporal).

La figura 5 muestra un ejemplo de un paciente cuya amplia respuesta de epítopo (primer punto temporal) remite (segundo punto temporal) y reaparece a lo largo de un periodo de doce meses (tercer punto temporal).

40 La figura 6 muestra un mapa de la especificidad fina de las regiones peptídicas identificadas en el ensayo de respuesta cinética que se obtiene a través de la utilización de TCC generado a partir de pacientes con EM e individuos sanos. La mayoría de los péptidos utilizados en ensayos de selección presentan 15 meros de longitud, sin embargo pocos presentan 10 meros y 1 péptido presenta 17 meros. Se somete a prueba la especificidad de cada TCC al menos dos veces.

45 La figura 7a es una tabla que muestra la caracterización de epítomos de células T dentro de una proteína básica de la mielina reconocida por linfocitos T de pacientes con EM.

La figura 7b es una tabla que muestra que todos los epítomos de células T no se presentan necesariamente por APC  
50 fijadas y por tanto no apítomos.

Las figuras 8 y 9 muestran la presentación de diversos péptidos MBP a clones de células T por APC fijadas y vivas. Figura 8A - 30-44, figura 8B - 110-124, figura 9A -130- 144, figura 9B - 156-170.

55 La figura 10 es una tabla que muestra valores de índice de estimulación (IE) pico para MBP y péptidos MBP en pacientes con EM obtenidos en tres puntos temporales separados. Las muestras para el segundo punto temporal se recogieron 4-8 meses tras el 1<sup>er</sup> punto temporal y las muestras para el 3<sup>er</sup> punto temporal se obtuvieron 3-5 meses tras el segundo punto temporal. Se midió cpm de fondo para cada día y variaba entre 80-700 cpm; una respuesta positiva (negrita) se definió según  $IE > 3$  y  $\delta cpm > 1000$ . (No fue posible recoger muestras para los tres puntos temporales de los pacientes EM 19 y EM 67).

60 La figura 11 es una tabla que muestra valores de índice de estimulación (IE) pico para MBP y péptidos MBP en individuos sanos. Se midió cpm de fondo para cada día y variaba entre 80-700 cpm; una respuesta positiva (negrita) se definió según  $IE > 3$  y  $\delta cpm > 1000$ .

65 La figura 12 muestra la respuesta de células T aisladas a partir de un ratón transgénico DR2:MBP82-100 frente a la presentación de péptidos MBP anidados en la región 77-100 por APC.

La figura 13 muestra la respuesta del clon de células T MS17:A3 frente a la presentación de péptidos MBP anidados en la región 125-148 por APC.

5 La figura 14 es una ilustración del reconocimiento de epítomos de células T dentro de la secuencia 89-101 de MBP. Hay tres epítomos de células T distintos pero solapantes dentro de la secuencia: 89-94, 92-98 y 95-101. Se muestra el potencial para la escisión entre los residuos 94 y 95 mediante la acción de asparaginil endopeptidasa (AEP).

10 La figura 15 muestra la capacidad de los péptidos MBP 87-96 (A) y 89-101 (B) para actuar como un apítomo para células T que responden frente al epítomo 89-94.

### Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un método para seleccionar un péptido tolerogénico.

#### Tolerancia

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tolerogénico" significa que puede de inducir tolerancia.

20 La tolerancia es la falta de respuesta frente a un antígeno. La tolerancia a antígenos propios es una característica esencial del sistema inmunitario, cuando se pierde, puede dar como resultado una enfermedad autoinmunitaria. El sistema inmunitario adaptativo debe mantener la capacidad para responder frente a una enorme variedad de agentes infecciosos mientras que evita un ataque autoinmunitario de los antígenos propios contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto se controla en gran medida por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros frente a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no se detectan todos los antígenos propios en el timo, de modo que la muerte de timocitos autorreactivos permanece incompleta. Por tanto, existen también mecanismos mediante lo que puede adquirirse tolerancia por linfocitos T autorreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). Una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica se facilita en Anderton *et al* (1999) (Immunological Reviews 169:123-137).

30 La tolerancia puede resultar de o caracterizarse por la inducción de una anergia en al menos una parte de las células T CD4+. Con el fin de activar una célula T, un péptido debe asociarse con una APC "profesional" que pueda suministrar dos señales frente a células T. La primera señal (señal 1) se suministra por el complejo MHC-péptido sobre la superficie celular de la APC y se recibe por la célula T por medio del TCR. La segunda señal (señal 2) se suministra por moléculas coestimuladoras sobre la superficie de la APC, tal como CD80 y CD86 y se recibe por CD28 sobre la superficie de la célula T. Se cree que cuando una célula T recibe la señal 1 en ausencia de señal 2, no se activa y de hecho, se vuelve anérgica. Las células T anérgicas no responden a una exposición antigénica posterior y puede que puedan suprimir otras respuestas inmunitarias. Se cree que las células T anérgicas están implicadas en la mediación de la tolerancia de células T.

40 Sin desear limitarse por la teoría, los autores de la presente invención predicen que los péptidos que requieren una transformación antes de que puedan presentarse junto con moléculas del MHC no inducen tolerancia porque tienen que tratarse por células presentadoras de antígeno maduras. Las células presentadoras de antígeno maduras (tales como macrófagos, células B y células dendríticas) pueden realizar una transformación antigénica, pero también suministrar tanto señales 1 como 2 a una célula T, conduciendo a la activación de células T. Por otro lado, los apítomos podrán unirse a MHC de clase II en APC inmadura. Por tanto se presentarán a las células T sin coestimulación, conduciendo a tolerancia y anergia de células T.

50 Por supuesto, apítomos también pueden unirse a moléculas del MHC en la superficie celular de APC madura. Sin embargo, el sistema inmunitario contiene una mayor abundancia de APC inmadura que madura (se ha sugerido que menos del 10% de células dendríticas están activadas, Summers *et al.* (2001) Am. J. Pathol. 159: 285-295). La posición por defecto para un apítomo será por tanto de anergia/tolerancia, en lugar de activación.

55 Se ha demostrado que, cuando la tolerancia se induce por inhalación de péptido, la capacidad de las células T CD4+ específicas de antígeno para proliferar se ve reducida. También, la producción de IL-2, la producción de IL-4 y IFN- $\gamma$  por estas células se regula por disminución, pero la producción de IL-10 se aumenta. Se ha demostrado que la neutralización de IL-10 en ratones en un estado de tolerancia inducida por péptido restablece por completo la propensión a enfermedad. Se ha propuesto que una población de células reguladoras persiste en el estado tolerante que produce IL-10 y media la regulación inmunitaria (Burkhart *et al* (1999) Int. Immunol. 11: 1625-1634).

60 La inducción de tolerancia puede monitorizarse por tanto mediante diversas técnicas incluyendo:

(a) la propensión reducida a contraer la enfermedad para la que el péptido es un epítomo diana *in vivo*;

65 (b) la inducción de anergia en células T CD4+ (que pueden detectarse mediante exposición posterior con antígeno *in vitro*);

(c) cambios en la población de células T CD4+, incluyendo:

(i) reducción en la proliferación,

5

(ii) regulación por disminución en la producción de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4, y

(iii) aumento en la producción de IL-10.

10 *Epítomos independientes de la transformación antigénica (APÍTOPOS)*

El método de la presente invención comprende la etapa de seleccionar un péptido que pueda unirse a una proteína del MHC de clase I o II sin transformación adicional. Tales péptidos se conocen en la presente memoria como "apítomos" (Antigen Independent epiTOPES).

15

La presentación en la superficie celular de péptidos derivados de un antígeno dado no es aleatoria y tiende a estar dominada por un pequeño número de epítomos que aparecen frecuentemente. La dominancia de un péptido particular dependerá de muchos factores, tales como la afinidad relativa para unirse a la molécula del MHC, punto espacio-temporal de la generación dentro de la APC y resistencia a la degradación. La jerarquía de epítomo para un antígeno puede cambiar con la progresión de una respuesta inmunitaria, que presenta importantes implicaciones para la autotolerancia y autoinmunidad. Es probable que las regiones dominantes inmunodominantes sean buenas tolerógenas. Por tanto, en una forma de realización preferida, el apítomo de la presente invención se basa en un epítomo dominante.

20

25

Sin embargo, tras una respuesta inmunitaria primaria frente a los péptidos inmunodominantes, la "propagación" de los epítomos puede producirse hasta determinantes subdominantes (Lehmann *et al* (1992) Nature 358:155-157). La presentación de epítomos subdominantes puede ser importante para provocar la autoinmunidad. El apítomo de la presente invención puede basarse por tanto en un epítomo subdominante.

30

Para cualquier antígeno dado pueden existir también epítomos crípticos. Los epítomos crípticos son los que pueden estimular una respuesta de células T cuando se administran como un péptido pero que no producen una respuesta de este tipo cuando se administran como un antígeno completo. Puede que durante la transformación del antígeno en péptidos en la APC se destruya el epítomo críptico. Los autores de la presente invención han demostrado que el péptido 92-98 es un epítomo críptico para MBP (ejemplo 2C). De manera interesante existe un supuesto sitio de escisión para la asparaginil endopeptidasa dentro de esta región peptídica, lo que puede significar que durante la transformación natural no se genera por la APC ningún péptido que contiene esta región.

35

40

Un epítomo críptico puede actuar como un apítomo *in vitro*, porque puede que pueda unirse a una molécula del MHC sin transformación adicional e inducir anergia en una célula T que reconoce el epítomo críptico. Sin embargo, sería poco probable que un apítomo de este tipo fuera terapéuticamente útil porque debería no poder tolerar las células T que reconocen un epítomo transformado de manera natural del antígeno.

45

Los epítomos para un antígeno pueden identificarse midiendo la respuesta de células T frente a los péptidos solapantes que comprenden todo el antígeno (véase a continuación) cuando se presenta por APC. Tales estudios dan como resultado habitualmente "conjuntos anidados" de péptidos y el epítomo mínimo para un clon/una línea de células T puede evaluarse midiendo la respuesta frente a péptidos truncados.

50

No puede asumirse que un epítomo mínimo de un antígeno se comportará como un apítomo. Posiblemente se requerirán aminoácidos que flanqueen el epítomo mínimo para la unión óptima al MHC. El apítomo debe concebirse para comprender la posibilidad de que puedan existir ligeras diferencias entre los epítomos mínimos de diferentes clones de células T.

55

Debe enfatizarse la posibilidad de que no sea posible identificar un apítomo para todos los epítomos. Existe una clara evidencia de que algunos epítomos se unen al MHC de un modo que depende de la carga del MHC en endosomas y por tanto requieren transformación (Viner *et al* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:2214-2218). Esto es otra razón de porqué no puede asumirse que cada epítomo mínimo se comportará inevitablemente como un apítomo.

*Identificación de péptidos que contienen epítomos de células T*

60

Existen varios métodos conocidos en la técnica para identificar los epítomos de células T dentro de un antígeno dado.

65

Pueden identificarse epítomos transformados de manera natural mediante análisis de espectrofotometría de masas de péptidos eluidos a partir de APC cargada con antígeno. Existen APC que o bien se han estimulado para captar antígeno, o bien se han forzado para producir la proteína de manera intracelular mediante transformación con el gen apropiado. Normalmente las APC se incuban con proteína o bien en disolución o bien dirigidas de manera adecuada

a la superficie celular de APC. Tras la incubación a 37°C se lisan las células en detergente y se purifica la proteína de clase II mediante, por ejemplo cromatografía de afinidad. El tratamiento del MHC purificado con un medio químico adecuado (por ejemplo, condiciones ácidas) da como resultado la elución de péptidos a partir del MHC. Se separa este conjunto de péptidos y se compara el perfil con el péptido procedente de APC control tratada del mismo modo.

5 Se analizan (por ejemplo mediante espectrometría de masas) los picos únicos para las células alimentadas/que expresan proteína y se identifican los fragmentos peptídicos. Este procedimiento genera habitualmente información sobre la gama de péptidos (habitualmente encontrados en "conjuntos anidados") generados a partir de un antígeno particular mediante transformación antigénica.

10 Otro método para identificar epítomos es examinar una biblioteca sintética de péptidos que solapan y comprenden la longitud del antígeno en un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, pueden utilizarse péptidos que tienen 15 aminoácidos de longitud y que solapan en 5 o 10 aminoácidos. Se someten a prueba los péptidos en un sistema de presentación de antígeno que comprende células presentadoras de antígeno y células T. Por ejemplo, el sistema de presentación de antígeno puede ser una preparación de esplenocitos de ratón, una preparación de células humanas de amígdala o  
15 PBMC. De manera alternativa, el sistema de presentación de antígeno puede comprender un clon/una línea de células T particular y/o un tipo de células presentadoras de antígeno particular.

Puede medirse la activación de células T mediante la proliferación de células T (por ejemplo utilizando incorporación de <sup>3</sup>H-timidina) o producción de citocinas. La activación de células T CD4+ de tipo TH1 puede detectarse por  
20 ejemplo mediante la producción de IFN $\gamma$  que puede detectarse mediante técnicas convencionales, tales como un ensayo ELISPOT.

Los estudios de péptidos solapantes indican habitualmente la zona del antígeno en la que se sitúa un epítomo. El epítomo mínimo para una célula T particular puede evaluarse entonces midiendo la respuesta frente a péptidos  
25 truncados. Por ejemplo si se obtiene una respuesta frente al péptido que comprende los residuos 1-15 en la biblioteca solapante, pueden utilizarse conjuntos que están truncados en ambos extremos (es decir, 1-14, 1-13, 1-12 etc. y 2-15, 3-15, 4-15 etc.) para identificar el epítomo mínimo.

Los autores de la presente invención predicen que la identificación de regiones inmunodominantes de un antígeno utilizando ensayos *in vitro* (especialmente los que utilizan líneas de células T) presenta un patrón sesgado de reactividad peptídica. En el estudio para identificar epítomos de MBP que se describe en los ejemplos, se utiliza un ensayo de respuesta cinética en el que se mide la proliferación de PBMC de pacientes con EM e individuos sanos frente a una biblioteca de péptidos solapantes. Este ensayo se basa en el hallazgo de que, aunque las células T de individuos normales y pacientes con EM responden de una manera similar frente a antígeno proteico purificado,  
30 responden de un modo diferente frente a péptidos basados en la secuencia de MBP. Las células T de pacientes con EM responden con una mayor magnitud y cinética más rápida frente a antígenos peptídicos en comparación con donantes sanos normales. Esto permite la selección e identificación del epítomo frente al que responde el paciente particular en un momento particular. En el estudio descrito en la presente memoria, este enfoque ha revelado varias regiones que contienen epítomo que no se identificaron utilizando técnicas convencionales. Además se muestra que  
35 el reconocimiento de células T muestra un patrón cíclico, apareciendo en un punto temporal, remitiendo y reapareciendo posteriormente en una fecha posterior.

El ensayo cinético descrito por los autores de la invención proporciona una herramienta valiosa porque revela el epítomo al que está respondiendo un paciente en un momento particular. Esta información puede utilizarse para  
45 confeccionar un enfoque de administración de apítomo terapéutico para un paciente particular identificando y administrando un apítomo para el epítomo relevante (si existe uno). Esta información puede permitir también preparar un patrón general para la progresión de enfermedad, de modo que puede concebirse la composición terapéutica para incluir apítomos para los epítomos que es probable que estén presentes en una fase dada durante la enfermedad.

50 *Sistemas de presentación independiente de la transformación antigénica (APIPS)*

Una vez se ha identificado un epítomo, la siguiente etapa es investigar si también se comporta como un apítomo.

55 Un apítomo debe presentarse a las células T sin necesidad de transformación antigénica. Teniendo péptidos identificados que contienen epítomos de células T, pueden identificarse apítomos utilizando un sistema libre de transformación. Pueden someterse a prueba péptidos truncados y análogos de péptido para determinar la activación utilizando un sistema de presentación independiente de transformación antigénica (APIPS).

60 Los ejemplos de APIPS incluyen:

a) APC fijada (con o sin anticuerpos frente a CD28);

b) membranas lipídicas que contienen moléculas del MHC de clase I o II (con o sin anticuerpos frente a CD28); y

65 c) MHC recombinante o natural purificado en forma unida a placa (con o sin anticuerpos frente a CD28).

Se conoce el uso de APC fijada para investigar las respuestas de células T, por ejemplo en estudios para investigar el epítipo mínimo dentro de un polipéptido, midiendo la respuesta frente a péptidos truncados (Fairchild *et al* (1996) Int. Immunol. 8: 1035-1043). Las APC pueden fijarse utilizando, por ejemplo formaldehído (habitualmente paraformaldehído) o glutaraldehído.

Pueden prepararse membranas lipídicas (que pueden ser membranas planas o liposomas) utilizando lípidos artificiales o pueden ser fracciones de microsoma/membrana plasmática de APC.

En su utilización, el AIPS puede aplicarse a los pocillos de una placa de cultivo de tejidos. Entonces se añaden los antígenos peptídicos y se detecta la unión del péptido a la parte del MHC del AIPS mediante la adición de clones o líneas de células T seleccionados. La activación del clon o la línea de células T puede medirse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia, por ejemplo mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina o la secreción de citocinas.

#### *Péptidos*

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar un péptido.

El término "péptido" se utiliza en el sentido normal para referirse a una serie de residuos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos  $\alpha$ -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos peptídicos sintéticos.

Los péptidos que unen a las moléculas de MHC de clase I son normalmente de 7 a 13, más normalmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se establece en sus dos extremos por contacto entre átomos en la cadena principal del péptido y lugares invariantes en la hendidura de unión al péptido de todas las moléculas de MHC de clase I. Hay sitios invariantes en ambos extremos de la hendidura que unen a los extremos carboxiterminales y aminotermiales del péptido. Las variaciones en longitud peptídica se ajustan mediante una retorcadura en el armazón peptídico, a menudo en los residuos de prolina y glicina que permiten la flexibilidad requerida.

Los péptidos que unen a las moléculas de MHC de clase II son normalmente de entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más usualmente entre 10 y 17 aminoácidos de longitud y pueden ser mucho más largos. Estos péptidos se encuentran en una conformación extendida a lo largo de la hendidura de unión al péptido del MHC II que (al contrario que la hendidura de unión al péptido del MHC de clase I) está abierta en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente mediante contactos de átomos de la cadena principal con residuos conservados que forran hendidura de unión al péptido.

El péptido seleccionado por el método de la presente invención puede prepararse utilizando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos mediante técnicas en fase sólida (Roberge JY *et al.* (1995) Science 269: 202-204), escindir de la resina y purificarse mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures and Molecular Principles, WH Freeman y Co, Nueva York NY). La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido puede prepararse de manera alternativa mediante medios recombinantes, o mediante escisión de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido puede obtenerse mediante escisión del antígeno diana. La composición de un péptido puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

En una realización preferida el péptido puede derivarse de un antígeno diana. Un antígeno diana es una molécula (por ejemplo una proteína o glicoproteína) que se transforma por APC y se reconoce por las células T durante el transcurso de la enfermedad. El antígeno diana dependerá, por supuesto, de la enfermedad diana. Puede que un péptido pueda derivarse de un fragmento del antígeno que se produce mediante la transformación natural del antígeno por una APC.

Para fines prácticos, existen otras características diversas que el péptido debe mostrar. Por ejemplo, el péptido debe ser soluble a una concentración que permite su utilización *in vivo*. Preferentemente el péptido debe ser soluble a concentraciones de hasta 0,5 mg/ml, más preferentemente el péptido debe ser soluble a concentraciones de hasta 1 mg/ml, lo más preferentemente el péptido debe ser soluble a concentraciones de hasta 5 mg/ml.

Para administración intranasal el volumen máximo de dosis que puede tomarse utilizando procedimientos actuales es de aproximadamente 200  $\mu$ l por fosa nasal. Si el péptido es soluble a 1 mg/ml, una dosis doble en cada fosa nasal permite administrar 800  $\mu$ g al paciente. No es habitual administrar más de 5 mg en ninguna dosis individual.

También es importante que el péptido sea suficientemente estable *in vivo* para ser terapéuticamente útil. Los autores de la presente invención han descubierto que *in vivo*, 30 minutos tras la administración la cantidad total de un péptido de prueba desciende hasta aproximadamente el 50%, 4 horas tras la administración la cantidad desciende hasta aproximadamente el 30%, sin embargo tras 5 días el péptido es todavía detectable (aproximadamente al 5%).

5 La semivida del péptido *in vivo* debe ser de por lo menos 10 minutos, preferentemente de por lo menos 30 minutos, más preferentemente de por lo menos 4 horas, más preferentemente de por lo menos 24 horas.

Los autores de la presente invención han descubierto que tras la administración intranasal, la cantidad de péptido en el ganglio linfático de drenaje alcanza el pico aproximadamente a las 4 horas tras la administración, sin embargo todavía puede detectarse el péptido (a niveles de aproximadamente el 5% como máximo) tras 5 días. Preferentemente el péptido es suficientemente estable para estar presente a una concentración terapéuticamente activa en el ganglio linfático de drenaje durante el tiempo suficiente para ejercer un efecto terapéutico.

10

El péptido debe mostrar también una buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido debe mantener una conformación *in vivo* que le permita unirse a una molécula del MHC en la superficie celular sin el debido impedimento.

15

#### *Enfermedades diana*

Un péptido seleccionado por el método de la presente invención puede ser útil en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

20

Es probable que un apítopo para el MHC de clase II sea particularmente útil en enfermedades que están mediadas por respuestas de células T CD4+. Por ejemplo, las enfermedades que se demuestran o mantienen mediante una respuesta de células T CD4+ inapropiada o excesiva.

25

Un péptido tal es probable que sea particularmente útil en el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad incluyen:

30

(i) alergias, que son el resultado de respuestas inapropiadas a sustancias extrañas inocuas;

(ii) enfermedades autoinmunes, que son el resultado de respuestas a antígenos de tejidos propios; y

(iii) rechazo de injertos, que son el resultado de respuestas a un trasplante.

35

Los ejemplos de alergias incluyen, pero no se limitan a: fiebre de heno, asma extrínseca, alergias a picaduras de insectos y a aguijones, alergias a la comida y a los fármacos, rinitis alérgica, asma bronquial, bronquitis crónica, síndrome anafiláctico, urticaria, angioedema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, eritema nodoso, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, rinoconjuntivitis, conjuntivitis, venulitis necrotizante cutánea, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedades cutáneas bullosas.

40

Ejemplos de las enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a: artritis reumatoide (AR), miastenia gravis (MG), esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune (tiroiditis de Hasimoto), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino, uveorretinitis autoinmune, polimiositis y ciertos tipos de diabetes, vasculitis sistémica, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica (escleroderma), síndrome de Sjogren, espondilitis anquilosante y espondiloartropatías relacionadas, fiebre reumática, neumonitis de hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, pneumoconiosis por polvos inorgánicos, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trastornos plaquetarios inmunológicos, criopatías tales como criofibrinogenemia y poliendocrinopatías autoinmunes.

45

Una diversidad de tejidos se trasplantan comúnmente en inmunología clínica, incluyendo riñón, hígado, corazón, pulmón, piel, córnea y médula ósea. Todos los injertos excepto los injertos corneales y algunos injertos de médula ósea requieren usualmente inmunosupresión a largo plazo en el presente.

50

Por ejemplo, el péptido puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de diabetes. En esta realización, el péptido puede ser derivable del antígeno diana IA2.

55

De manera alternativa, el péptido puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por múltiples lesiones desmielinizantes a lo largo de la sustancia blanca del SNC y que se producen en diversos sitios y momentos (McFarlin y McFarland, 1982 *New England J. Medicine* 307:1183-1188 y 1246-1251). Se cree que la EM está mediada por células T autorreactivas.

60

El péptido puede derivarse de uno de los autoantígenos, en particular de la proteína básica de la mielina (MBP) o de la proteína proteolipídica (PLP). Posiblemente la MBP es más apropiada que la proteína proteolipídica (PLP), porque PLP es altamente hidrófoba y los péptidos derivados de ella tienden a amontonarse. La MBP es inmunogénica y los linfocitos T específicos de MBP presentan actividad encefalitogénica en animales (Segal *et al.*, 1994 *J.*

65

Neuroimmunol. 51:7-19; Voskuhl *et al.*, 1993 J. Neuroimmunol 42:187-192; Zamvil *et al.*, 1985 Nature 317:355-8).

El péptido puede ser derivable de una de las regiones inmunodominantes de MBP, a saber: 1-24, 30-54, 75-99, 90-114, 105-129, 120-144, 135-159 y 150-170.

5 Pueden utilizarse apítopos para el MHC de clase I, por ejemplo, para modificar respuestas de CD8+ antivirales de una manera tolerogénica.

*Composición farmacéutica*

10 Los autores de la presente invención predicen que, a pesar de la "supresión transeúnte" puede ser necesario seleccionar como diana un número diferente de clones de células T con el fin de inducir tolerancia de manera eficaz. Por tanto, puede administrarse una pluralidad de péptidos a un individuo con el fin de prevenir o tratar una enfermedad.

15 Los péptidos seleccionados por un método de acuerdo con la presente invención se pueden usar en una composición farmacéutica comprendiendo una pluralidad de apítopos.

20 La composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo entre 2 y 50 apítopos, preferentemente entre 2 y 15 apítopos. Los apítopos pueden ser derivables del mismo antígeno o de diferentes antígenos. Preferentemente los apítopos bien son todos capaces de unir a MHC de clase I, o bien son todos capaces de unir a MHC de clase II, sin transformación adicional. Preferentemente todos los apítopos en la composición farmacéutica bien son capaces de unir a MHC de clase I o de clase II sin procesamiento adicional.

25 La composición farmacéutica puede estar en forma de un kit, en el que algunos o cada uno de los apítopos se proporcionan por separado para administración simultánea, separada o secuencial.

30 De manera alternativa (o además) si la composición farmacéutica (o cualquier parte de la misma) va a administrarse en múltiples dosis, cada dosis puede envasarse por separado.

La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del o cada apítopo y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 También, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el o cada apítopo puede combinarse con cualquier/cualesquiera aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización adecuado(s).

*Administración*

40 El péptido debe administrarse en forma soluble en ausencia de adyuvante.

Preferentemente el péptido se administra por vía mucosa.

45 Los estudios han demostrado que el péptido, cuando se administra en forma soluble por vía intraperitoneal (i.p.), por vía intravenosa (i.v.) o por vía intranasal (i.n.) o por vía oral puede inducir tolerancia de células T (Anderton y Wraith (1998) tal como anteriormente; Liu y Wraith (1995) tal como anteriormente; Metzler y Wraith (1999) Immunology 97:257-263).

50 Preferentemente el péptido se administra por vía intranasal.

Los estudios en ratones han demostrado que la duración de la administración de péptido requerida para inducir tolerancia depende de la frecuencia de precursor de las células T en el receptor (Burkhart *et al.* (1999) tal como anteriormente). En muchos estudios experimentales, se ha demostrado que se requieren dosis repetidas de péptido para inducir tolerancia (Burkhart *et al.* (1999) tal como anteriormente). Por tanto la dosis exacta y el número de dosis dependerán del individuo, sin embargo, en una realización preferida se administra una pluralidad de dosis.

Si se administra una pluralidad de péptidos simultáneamente, pueden estar en forma de un "cóctel" que es adecuado para la administración en dosis únicas o múltiples. De manera alternativa puede resultar preferido administrar dosis múltiples pero variar las concentraciones relativas de los péptidos entre dosis.

60 En una forma de realización preferida puede seguirse un protocolo de "escalada de dosis", en el que se administra una pluralidad de dosis a un paciente en concentraciones ascendentes. Se ha utilizado un enfoque de este tipo, por ejemplo, para los péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia al veneno de abeja (Müller *et al.* (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 y Akdis *et al.* (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

65 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, pero no deben interpretarse como una limitación de la misma. La invención hace particularmente referencia a las formas de realización específicas descritas en estos ejemplos.

5 Ejemplo 1 - Identificación de epítomos de células T en MBP

*Materiales y Métodos*

10 ANTÍGENOS

Se prepara MBP humana a partir de la sustancia blanca del cerebro tal como se describe por Deibler *et al.* (Deibler *et al.*, 1972 Preparative Biochemistry 2:139) y se evalúa su pureza mediante SDS-PAGE. Se usan MBP y derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis* (UK Central Veterinary Laboratory, Surrey) en ensayos proliferativos a concentraciones óptimas determinadas previamente; la concentración óptima para cada antígeno es de 50 µg/ml. Se sintetiza un panel de péptidos solapantes de 15 meros que abarca toda la molécula de MBP utilizando la química F-moc convencional en un sintetizador de péptidos múltiple Abimed AMS 422 (Abimed, Langenfeld, Alemania). Cada péptido se desplaza en 5 aa y solapa en 10 aa. Los autores de la presente invención producen 33 péptidos que se reúnen en grupos de 3 y se someten a prueba los conjuntos a la concentración óptima de 50 µg/ml, de modo que *in vitro* cada péptido está presente a una concentración de 16,6 µg/ml.

PACIENTES Y SUJETOS CONTROL

25 Los sujetos de este estudio consisten en 12 pacientes con EM confirmada clínicamente o confirmada con apoyo del laboratorio (Poser *et al.*, 1983), con un intervalo de edades de 29-51 años. Ocho de los 12 pacientes están implicados en un ensayo de interferón-β, en cambio todos los demás pacientes con EM no han recibido tratamiento de corticosteroides durante al menos 3 meses antes del comienzo del estudio. El grupo control consistía en 13 individuos sanos con un intervalo de edades de 25-55 años y ninguno había recibido tratamiento inmunosupresor durante al menos 3 meses antes de obtenerse la muestra de sangre.

30 MEDIO DE CULTIVO DE TEJIDOS

Se utiliza medio RPMI-1640 complementado con HEPES 20 mM (Sigma, Poole, UK), penicilina (100 U/ml), sulfato de estreptomina (100 mg/ml) y L-glutamina 4 mM (todos de Life Technologies, Paisley, Escocia), como medio de cultivo de tejidos. Se utiliza medio sin suero para lavar los linfocitos y TCL. Para todos los ensayos y las condiciones de cultivo, se complementa el medio con plasma autólogo inactivado por calor al 10%.

CONDICIONES DE CULTIVO Y ENSAYOS PROLIFERATIVOS DE CÉLULAS T

40 Se extrae sangre periférica citrada (50-100 ml) mediante punción venosa de cada sujeto después de obtenerse el consentimiento informado por escrito. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de la sangre mediante centrifugación por densidad en Histopaque-1077 (Sigma, Poole, UK) y se cultivan en volúmenes de 1,5 ml en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Nunc International, Costar, Corning Inc. Nueva York, US) a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por ml, que contienen bien PPD, MBP o bien péptidos de MBP. Se incuban las placas a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Entre los días 5 y 14 se retiran alícuotas por duplicado de 100 µl de cada cultivo, se transfieren para una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos y se someten a pulsos con 0,4 µCi de [<sup>3</sup>H]-Timidina (Amersham International, Amersham, UK). Tras 18 horas se recogen las células en placas de fibra de vidrio (LKB-Wallac, Turku, Finlandia) utilizando un colector 96 Mach 111 (Tomtec, Orange, Nueva Jersey, US). Se determina la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina utilizando un contador de centelleo líquido Microbeta (LKB-Wallac). Los pocillos de prueba que contienen antígeno se consideran positivos cuando el δcpm >1000 y el índice de estimulación (IE) > 3, cuando IE = CPM del cultivo que contiene antígeno/CPM del cultivo sin antígeno.

55 GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CÉLULAS T Y CLONES DE CÉLULAS T

Se generan líneas de células T (TCL) específicas para MBP de 8 pacientes con EM y 2 donantes control sanos. Se separan PBMC de cada sujeto tal como se describió anteriormente y se siembran en placa a  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de 6 pocillos en presencia de MBP (50 µg/ml); se congela regularmente una parte de las PBMC de cada sujeto y se almacena para reestimulaciones posteriores. Siete días después se alimentan las células con medio reciente que contiene IL-2 al 2% (Lymphocult-HT; Biotest LTD., Birmingham, UK) y en el día 12 de cultivo se reestiman todas las células con antígeno, IL-2 y PBMC autólogas irradiadas (2500 Rad) como una fuente de células presentadoras de antígeno (APC), a una proporción celular de 1 célula T:5 APC. Se expanden las células en IL-2 cada 3-4 días y en el día 14 se reestiman con antígeno, IL-2 y PBMC, tal como se describió anteriormente. En el día de la primera reestimulación se examinan las células para determinar la proliferación específica para MBP. En resumen,  $2 \times 10^4$  células T y  $1 \times 10^5$  PBMC autólogas irradiadas se cultivan por triplicado, en placas de fondo

redondo de 96 pocillos, en presencia de MBP. Se cultivan las células durante 2 días y se someten a pulsos con (<sup>3</sup>H)-timidina a 0,4 µCi/pocillo durante las últimas 18 horas del cultivo. Entonces se recogen las células tal como se describió anteriormente y se considera que una TCL es específica para MBP con un δcpm > 1000 y un IE>3.

- 5 Tras 3 ciclos de reestimulación/expansión se clonan las TCL utilizando PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) en presencia de PBMC autólogas irradiadas como APC. Se siembran las células T en placa en condiciones de dilución limitantes a 0,1 células/pocillo, 0,3 células/pocillo y 1 célula/pocillo y se cultivan en placas Terasaki (Nunc International, Costar) con 1 x 10<sup>4</sup> PBMC irradiadas, PHA 5 µg/ml e IL-2 al 2%. Tras 10-12 días, se expanden los pocillos positivos para el crecimiento en placas de fondo redondo de 96 pocillos, utilizando 1 x 10<sup>5</sup> PBMC irradiadas, PHA 5 µg/ml e IL-2. Tres días después se alimentan los pocillos con medio reciente que contiene IL-2 y en el día 7 se expanden los clones en placas de 48 pocillos utilizando 5 x 10<sup>5</sup> PBMC irradiadas, PHA e IL-2; en este punto se someten a prueba los clones en ensayos de proliferación para determinar las respuestas específicas frente a MBP. Se expanden los clones específicos para MBP una semana después sobre placas de 24 pocillos, utilizando 1 x 10<sup>6</sup> PBMC irradiadas con PHA o Dynabeads (Dyna, UK) e IL-2. Se mantienen los clones en placas de 24 pocillos utilizando un ciclo de reestimulación/expansión de 7-10 días, esencialmente tal como se describió anteriormente. Se somete a prueba la capacidad de los clones de células T (TCC) para reconocer el panel de péptidos MBP mediante ensayos de proliferación, tal como se describió anteriormente.

### Resultados

#### 20 RECONOCIMIENTO DE PÉPTIDO-MBP ENTRE LOS PACIENTES CON EM E INDIVIDUOS SANOS

Los autores de la presente invención utilizan un ensayo de respuesta cinética en el que PBMC de pacientes con EM y sujetos sanos se someten a prueba para determinar su capacidad respondiendo a un panel de péptidos sintéticos de 15 meros solapantes que comprende la longitud completa de la MBP humana. Se examina la respuesta proliferativa de PBMC de cada cultivo en 5 puntos temporales a lo largo de un periodo de 2 semanas y el perfil cinético de la respuesta frente a MBP y péptidos se compara con la respuesta frente a PPD, representando el último una respuesta secundaria/antígeno de memoria. No se aprecia ninguna diferencia significativa en la respuesta de PBMC frente a MBP y/o péptidos entre pacientes con tratamiento con interferón-β y aquellos sin tratamiento (datos no mostrados). La respuesta frente a MBP tanto en pacientes con EM como en controles sanos alcanzó el pico más tarde que la respuesta frente a PPD, siguiendo de ese modo las características cinéticas de la respuesta frente a un antígeno no de memoria. La figura 1 muestra un ejemplo típico del perfil cinético para PPD y MBP en pacientes con EM e individuos sanos.

35 Tal como se muestra en la figura 2, los dos péptidos más comúnmente reconocidos por pacientes con EM son 90-114 y 75-99 (6/12 pacientes cada uno), seguido de las regiones 30-54, 135-159 y 150-170 (5/12 pacientes) y 1-24 y 105-129 (4/12 pacientes). Tres pacientes responden a los aa 15-39 y 120-144. Dos pacientes reconocen 45-69 y ninguno de los pacientes con EM responde a la región 60-84.

40 Según la figura 10, cuando todos los pacientes son HLA-DR2 positivos, los dos péptidos más comúnmente reconocidos por pacientes con EM son 90-114 y 75-99 (6/11 pacientes cada uno), seguidos de las regiones 120-144, 135-159 y 150-170 (5/11 pacientes) y 1-24, 15-39, 30-54 y 105-129 (4/11 pacientes). Tres pacientes responden a los aa 45-69 y de nuevo ninguno de los pacientes con EM responde a la región 60-84.

45 En contraste, los individuos sanos reconocen significativamente menos péptidos, respondiendo solamente 2 sujetos control a más de 2 péptidos (C y J; figura 3). Los individuos control C y J son los dos únicos que reconocen los aa 60-84, una región no vista por este grupo de pacientes. De manera interesante, ambos individuos expresan el alelo DRB1\* 0701. Ninguno de los donantes sanos reconoce las regiones 45-69 y 105-129, mientras que 4 individuos sanos reconocen 75-99 y 150-170; tres individuos sanos reconocen 135-159; dos individuos sanos reconocen 1-24, 30-54, 60-84 y 120-144; y un individuo reconoce 15-39 y 90-114. En total, 8/13 de los individuos sanos no responden a ninguno de los péptidos solapantes, mientras que solamente 1/12 de los pacientes con EM (EM 19) constantemente no reconocen los péptidos MBP. De manera notable este paciente es el único en no responder a proteína MBP.

55 La figura 11 también muestra la respuesta de individuos sanos frente a péptidos MBP. En este estudio, solamente 1 sujeto control responde a más de 2 péptidos (N11). N11 es también el único individuo que reconoce los aa 60-84, una región no vista por este grupo de pacientes. Ninguno de los donantes sanos reconoce las regiones 15-39, 45-69 y 105-129, mientras que dos individuos sanos reconocen 120-144 y 135-159; y un individuo reconoce 1-24, 30-54, 60-84, 75-99, 90-114 y 150-170. En total, 9/12 de los individuos sanos no responden a ninguno de los péptidos solapantes.

65 En total, el día en el que la respuesta a MBP y/o péptidos alcanzó el pico no difería significativamente entre individuos sanos y pacientes y la cinética en ambos grupos se asemejaba a aquellas de una respuesta antigénica primaria. Además, la magnitud de la respuesta frente a MBP y péptidos no difería entre pacientes e individuos sanos.

## CAMBIOS EN EL RECONOCIMIENTO DE PÉPTIDO-MBP A LO LARGO DEL TIEMPO

Habiéndose establecido que los pacientes con EM responden a un amplio espectro de péptidos MBP, los autores de la presente invención decidieron examinar si el reconocimiento de PBMC en los mismos individuos está centrado y es estable a lo largo del transcurso de aproximadamente de 4-12 meses. Tal como se muestra en las figuras 2, 10 y 3 ni los pacientes con EM ni los individuos sanos mostraron el mismo patrón de reconocimiento de péptidos.

La figura 4 representa un ejemplo de un paciente con EM (EM 49) que responde a múltiples péptidos en 2 puntos temporales diferentes, pero el perfil de reconocimiento durante el segundo punto temporal, medido 4 meses después, difiere significativamente. Es decir, en el segundo ensayo cinético la respuesta de PBMC frente a los aa 15-39, 30-54 y 150-170 persiste, sin embargo la respuesta frente a 75-99 y 105-129 remite y se desplaza a las regiones 90-114 y 135-159.

La figura 5 (EM 60) ilustra un ejemplo de un paciente cuya respuesta amplia frente a epítopo remite hasta una respuesta centrada a lo largo del periodo de 4 meses. Los individuos sanos que se someten a prueba en la segunda vez no responden a ninguno de los péptidos (figura 3).

En total, los resultados demuestran que los pacientes con EM no muestran patrones fijos de reconocimiento. En cada paciente la respuesta de PBMC frente a varios péptidos puede persistir, remitir y desplazarse a nuevas regiones de MBP, tal como se observa en el paciente EM 49.

## CICLO DE RECONOCIMIENTO DE PÉPTIDO

Cuando se analiza la respuesta de PBMC frente a péptidos en 3 o más puntos temporales diferentes a lo largo de un periodo de 12 meses, se pone de manifiesto que en ciertos pacientes el reconocimiento de epítopo parece fluctuar en lugar de desplazarse irreversiblemente a nuevas regiones peptídicas. Por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 2 y 10, el paciente EM 60 muestra un patrón cíclico de reconocimiento para los aa 120-144 y 135-159; es decir, los residuos 120-144 y 135-159 están entre muchos reconocidos en el primer punto temporal sometido a prueba, la respuesta frente a estas 2 regiones remite en el segundo punto temporal y luego reaparece en el tercer punto temporal medido 4 meses después. El perfil cinético del paciente EM 41 demuestra, de manera similar, que el reconocimiento de los aa 135-159 fluctúa a lo largo de varios puntos temporales (véanse las figuras 2 y 10).

Entre el grupo control sano (figura 3), un individuo (M) muestra una respuesta fluctuante frente a las regiones 75-99 y 135-159, un segundo individuo (F) reconoce 75-99 en dos de los tres puntos temporales analizados, mientras que un tercer sujeto (D) muestra una respuesta cíclica frente al residuo 15-39.

## MAPEO FINO DE LA RESPUESTA FRENTE A MBP

Se generan TCC de 8 pacientes con EM y 2 individuos sanos y se utilizan para aclarar la especificidad fina de las regiones peptídicas identificadas en el ensayo de respuesta cinética. Se somete a prueba la especificidad de cada TCC mediante su respuesta proliferativa frente al panel de péptidos de 15 meros. El clon SD:A7 reconoció la región 1-24 y dentro de esta región este TCC respondió a los aa 5-19. La región 30-54 se reconoce por 4 clones (MS49:D3, MS49:C8, MS49:A8, MS49:B6) y el epítopo dentro de esta región es 30-44. Un clon (MS39:D7) de un paciente con EM reconoce el péptido 60-74 y de manera interesante un individuo sano responde a esta región (60-84) en nuestro ensayo de respuesta cinética. Cinco clones (MS43:A7, MS41:B6, MS41:A2, MS41:C6, N5:8) reconocen los aa 83-99 que están contenidos en la región 75-99. Un paciente produjo TCC específico para los aa 110-124 (MS60:A2, MS60:B3), contenidos dentro del conjunto 105-129 y otro TCC del mismo paciente es específico para 130-144 (MS60:E1), encontrado dentro de la región 120-144. Cinco individuos producen clones que reconocen epítopos dentro de la región 135-159: MS60:F7, MS60:D1, MS59:F1 y N5:19 reconocen los aa 140-154; MS57:A1 es específico para 140-149 y MS17:A3 de TCC responde a la secuencia 130-144. Este panel de clones demuestra claramente la presencia de al menos 2 epítopos de células T dentro de la región 135-159 de MBP. Por último, la región 150-170 se reconoce por 2 clones específicos para los aa 156-169. La especificidad de todos los TCC se resume en la figura 6.

Ejemplo 2 - Identificación de epítopos en MBP*Materiales y métodos*

## ENSAYO DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO UTILIZANDO UN APIPS

La presentación de los péptidos a los clones de células T se mide mediante proliferación. Se fijan las APC en paraformaldehído al 0,5% y se siembran en placa a  $1 \times 10^5$  células por pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Los clones de células T se siembran en placa a  $2 \times 10^4$  células por pocillo en presencia de concentraciones variables de péptido. Tras la incubación durante 48 h a 37°C, se mide la proliferación mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina a lo largo de 16-20 h. Se comparan los resultados con la capacidad de las células T para responder al epítopo presentado por APC vivas.

La presentación de péptidos a células T aisladas a partir de ratón transgénico DR2:MBP82-100 fue esencialmente tal como se describió anteriormente con la excepción de que las APC se sembraron en placa a  $5 \times 10^5$  células por pocillo, las células T se sembraron en placa a  $1 \times 10^5$  células por pocillo y se dejó avanzar la incubación durante 72 h antes de la adición de [ $^3$ H]-timidina.

#### Resultados

En este experimento, los péptidos que se han identificado como epítomos en el ejemplo anterior se examinan para determinar su capacidad para presentarse utilizando un AIPIS. Los resultados se muestran en la figura 7b. De los cinco epítomos examinados hasta ese momento, se encontró que cuatro eran apítomos (30-44, 80-94, 110-124 y 130-144) y se encontró que uno actuaba como un epítomo pero no como un apítomo (156-170).

#### Ejemplo 2A - Investigación de péptidos MBP 30-44, 110-124, 130-144 y 156-170

Con el fin de investigar si diversos péptidos MBP son apítomos, se investiga su capacidad para presentarse a células T por APC fijadas. Las células Mgar (HLA-DR2+ve) vivas o sometidas a pulsos previamente se someten a pulsos previamente con el péptido en suero, o suero solo durante 3,5 horas. Entonces se elimina el péptido en exceso de las células y se añade el clon de célula T apropiado. La respuesta proliferativa de células T se mide mediante la captación de  $^3$ H-timidina.

Tal como se representa en las figuras 8 y 9, los péptidos 30-44 (figura 8A), 110-124 (figura 8B) y 130-144 (figura 9A) pueden presentarse por APC fijadas sin transformación adicional. Por tanto se definen estos péptidos como apítomos. El péptido 156-170, por otro lado, requiere transformación adicional para la presentación a células T (figura 9B). Las APC fijadas no pueden presentar este epítomo a células T, de modo que 156-170 no es un apítomo.

#### Ejemplo 2B - Identificación de apítomos dentro de las regiones 77-100 y 125-148 de MBP

Para cualquier epítomo dado, puede existir uno o más apítomos, que pueden presentarse a APC sin transformación adicional. Se investiga la presencia de apítomos dentro de dos regiones de MBP incubando células Mgar (HLA-DR2+ve) vivas o fijadas en p-formaldehído, se incuban con péptidos solapantes en suero de las regiones de MBP 77-100 (figura 12) y 125-148 (figura 13) o en suero solo. Se añadieron las células T y tras 72 h (figura 12) o tras 48 h (figura 13) se midió la respuesta proliferativa de células T mediante captación de H-timidina. Para MBP 77-100, las células T se aíslan a partir de un ratón transgénico DR2: MBP 82-100, mientras que para MBP 130-144 se utilizó el clon de célula T MS17:A3.

Para la región de MBP 77-100 los siguientes péptidos se definen como apítomos:

MBP 83-99 ENPVVHFFKNIVTPRTP

MBP 80-94 TQDENPVVHFFKNIV

MBP 81-95 QDENPVVHFFKNIVT

MBP 82-96 DENPVVHFFKNIVTP

MBP 83-97 ENPVVHFFKNIVTPR

MBP 84-98 MPVVHFFKNIVTPRT

La secuencia de MBP mínima reconocida por las células T de ratón transgénico DR2 MBP 82-100 es la región 85-94.

Para la región de MBP 125-148 los siguientes péptidos se definen como apítomos:

MBP 130-144 RASDYKSAHKGFKGV

MBP 131-145 ASDYKSAHKGFKGVD

MBP 132-146 SDYKSAHKGFKGVDA

MBP 133-147 DYKSAHKGFKGVDAQ

La secuencia de MBP mínima reconocida por el clon de célula T MS17:A3 es la región 133-144.

#### Ejemplo 2C - Investigación de la región 89-101 de MBP

Los autores de la presente invención han demostrado anteriormente que, en contraste con otros epítomos de células T de mielina, la administración de péptido 89-101 en forma soluble no previene la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) murina inducida con bien la mielina completa o bien el propio péptido 89-101 (Anderton y Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251).

#### MBP 89-101 COMPRENDE TRES EPÍTOPOS DE CÉLULAS T

Con el fin de investigar la reactividad de células T frente a la región 81-111 de MBP, células de ganglio linfático de ratones sensibilizados con 81-111 se estimulan con 81-111 *in vitro* y estas células se someten a prueba con un panel de péptidos solapantes de 10 meros con desplazamientos de dos residuos que cubren la región 81-111 (concretamente: 81-90, 83-92, 85-94, 87-96, 89-98, 91-100, 93-102, 95-104, 97-106, 99-108 y 101-111). El patrón de respuesta frente a péptidos que comprenden la 89-101 muestra la capacidad de estimulación para 5 péptidos adyacentes (87-96 N terminal hasta 95-104) reflejando la presencia de al menos dos (y tal vez tres) epítomos distintos.

Con el fin de investigar esta región adicionalmente, se generan tres sublíneas de la línea de células T que responden a 81-111 original y estas se someten a prueba de nuevo con un panel de péptidos solapantes de 10 meros con desplazamiento de un residuo que cubre la región 84-106. Los resultados revelan la existencia de tres epítomos de células T distintos pero solapantes dentro de la secuencia 89-101: 89-94, 92-98 y 95-101 (véase la figura 14).

#### EL PÉPTIDO MBP 92-98 ES UN EPÍTOPO CRÍPTICO

Las tres líneas de células T (TCL) específicas de epítomo muestran diferencias interesantes cuando se someten a prueba para determinar la reactividad frente al péptido 89-101 y MBP recombinante completa. Las tres TCL responden al péptido (89-101) pero solamente las TCL específicas de 89-94 y 95-101 responden a MBP completa. Esto indica que la transformación antigénica de la MBP intacta genera preferentemente ligandos para células T que reconocen 89-94 y 95-101 pero no las que reconocen 92-98. Esto sugiere que el epítomo 92-98 es críptico (es decir no puede generarse mediante transformación de antígeno nativo). Parece que el péptido MBP 89-101 puede tomar parte en tres interacciones distintas con la molécula del MHC dando como resultado ligandos de péptido/MHC que se reconocen por tres poblaciones de células T separadas. Sin embargo la transformación de MBP solamente genera ligandos para dos de estas poblaciones de células T (ver la figura 14).

La inducción de EAE requiere el reconocimiento de células T de epítomos autoantigénicos expresados en el SNC como resultado de la degradación de MBP intacta. La inmunización de ratones con péptidos que comprenden solamente uno de los tres epítomos de células T identificados anteriormente muestra que solamente los que contienen un epítomo transformado de manera natural (89-94 o 95-101) pueden inducir EAE. Esto apoya adicionalmente el hallazgo de que 92-98 es un epítomo críptico.

#### EL PÉPTIDO MBP 92-98 ES EL EPÍTOPO DOMINANTE PARA LA REGIÓN 89-101 DE MBP

Tal como se mencionó anteriormente, la región 89-101 contiene tres péptidos distintos pero solapantes. De estos, el péptido 92-98 parece ser dominante para esta región. Por ejemplo, cuando se generan clones de células T a partir de ratones sensibilizados con el péptido 89-101, los seis clones que se generaron responden al 92-98. Utilizando péptidos análogos a 89-101 que contienen sustituciones de alanina individuales en cada posición, se ha descubierto que la sustitución de cualquiera de las posiciones 92-98 conduce a una falta de receptividad, mostrando que la alteración de cualquier residuo dentro del núcleo de 92-98 presenta efectos enormes sobre el reconocimiento de este epítomo.

#### EL PÉPTIDO MBP 89-101 NO PRODUCE TOLERANCIA DE LAS CÉLULAS T RELEVANTES PARA EAE QUE RECONOCEN UN EPÍTOPO DE MBP TRANSFORMADO DE MANERA NATURAL.

Resumiendo los hallazgos anteriores, los autores de la presente invención han descubierto que a) la secuencia 89-101 presenta el potencial de generar 3 epítomos de células T distintos; b) solamente dos de estos epítomos (89-94 y 95-101) se generan mediante transformación antigénica de MBP intacta (tanto *in vitro* como *in vivo*); c) solamente los péptidos que contienen los epítomos transformados de manera natural y no los que contienen un epítomo críptico son eficaces para inducir EAE; d) el péptido 89-101 no protege frente a EAE en experimentos de tratamiento con péptido.

Esta información proporciona una base para investigar la hipótesis de que el péptido 89-101 no produce tolerancia frente a EAE a través de un fallo en unir directamente las células T relevantes para la enfermedad. Con el fin de apoyar la hipótesis, el péptido (89-101) debe no inducir tolerancia al epítomo encefalitogénico principal (89-94) puesto que no se unirá directamente al elemento de restricción del MHC (I-A<sup>s</sup>) en la conformación apropiada. En otras palabras, 89-101 no actuará como un apítomo para células T que responden a 89-94.

Con el fin de someter a prueba esta posibilidad se realizan experimentos de tolerancia con los péptidos 89-101 y 87-96 (figura 15 A & B). El péptido 87-96 contiene el epítipo (89-94) más eficaz para inducir EAE.

#### Métodos

5 Los ratones recibieron 200 µg de péptido en PBS o PBS sola por vía intraperitoneal en los días -8, -6 y -4 antes de 100 µg de péptido en adyuvante completo de Freund en el día 0. Tras 10 días, se cultivaron células de ganglio linfático de drenaje ( $6 \times 10^5$  por pocillo) en medio X-Vivo 15 complementado con 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M y L-glutamina 2 M con o sin antígeno durante 72 horas. Se sometieron a pulsos los cultivos durante las 16 horas finales con 0,5 µCi de  $^3\text{H}$ .timidina y se midió la incorporación utilizando un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como recuentos medios por minuto para cultivos por triplicado.

#### Resultados

15 La sensibilización con 87-96 indujo una respuesta de memoria fuerte para sí mismo y una respuesta más débil para 89-101 (figura 15 A y B □ y ○ respectivamente). Esto concuerda con la necesidad de transformación antigénica generando 89-94 a partir de 89-101. La utilización de 87-96 como tolerógeno antes de sensibilizar con 87-96 suprimió las respuestas de memoria tanto frente a 87-96 como a 89-101 (figura 15A ■ y ●). Esto se corresponde con células T reactivas a 89-94, una vez que se hace que no respondan *in vivo*, que no responden *in vitro* a 89-94 tanto si se generan a partir de 89-96 como de 89-101. De manera crucial, sin embargo, la utilización de 89-101 como el tolerógeno antes de sensibilizar con 87-96 no inhibió las respuestas de memoria o bien a 87-96 o bien a 89-101 (figura 15 B A ■ y ●). Estos datos demuestran que la administración de péptido 89-101 en forma tolerogénica no produce tolerancia al epítipo encefalitogénico transformado de manera natural basado en la secuencia 89-94: el péptido 89-101 no se comporta como un apítipo para el epítipo 89-94.

25 Sin desear limitarse por la teoría, los autores de la presente invención creen que las observaciones pueden explicarse por la posición del péptido 89-101 en el sitio de unión del péptido del MHC. Si el péptido se une de preferentemente de modo que la región 92-98 está en el hueco de unión a péptido, entonces se reconocerá por células T específicas de MBP92-98. Esto explicaría por qué, cuando se sensibilizan los ratones con el péptido MBP89-101, todos los clones de células T generados reconocen el epítipo MBP92-98. Igualmente, cuando se utiliza 89-101 para producir tolerancia de las células T, producirá tolerancia principalmente de las células que reconocen el epítipo MBP92-98. Si MBP92-98 es un epítipo críptico, no se genera por transformación natural del antígeno completo y las células T que reconocen este epítipo probablemente no existirán *in vivo*. Incluso si una célula de células T específica de MBP92-98 existiese *in vivo*, no sería relevante para la enfermedad. Por tanto, 89-101 no previene EAE inducida con MBP completa.

#### Ejemplo 3 - Tratamiento con péptido para un modelo de ratón de EM

40 Los autores de la presente invención han demostrado anteriormente que una única dosis de antígeno peptídico administrado de manera sistémica tanto por vía intraperitoneal (Liu y Wraith (1995) *Int Immunol* 8:1255-1263) como por vía intranasal (Metzler y Wraith (1993) 5:1159-1165) protegerá de manera eficaz a los ratones de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) durante hasta tres meses (Metzler y Wraith (1999) *Immunology* 97:257-263). Se necesitaron al menos 5 dosis de péptido para inducir tolerancia en el ratón transgénico Tg4 (Burkhart *et al.* (1999) 11:1625-1634) que expresa un receptor de células T específico de EAE (Liu *et al.* (1995) *Immunity* 3:407-415). Un trabajo reciente ha demostrado que la vía intranasal (IN) es más segura que la vía intraperitoneal (IP) en el ratón Tg4, incluso si ambos enfoques son igualmente seguros en el ratón no transgénico.

50 Se somete a prueba el péptido 83-99 de MBP en el ratón transgénico Fug/D6 que expresa tanto la molécula del MHC clase II HLADR2 apropiada como un TCR de un clon de célula T humana específico para este péptido. Se tratan los ratones con péptido siguiendo la dosis convencional utilizada para el tratamiento del ratón transgénico Tg4 (protocolo Tg4) o el protocolo de desensibilización de escalada de dosis de péptido que se ha utilizado en el tratamiento de pacientes que padecen alergia (protocolo de desensibilización).

55 Protocolo Tg4: se tratan los grupos de ratones mediante administración intranasal de péptido 83-99 (4 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) o PBS sola en un volumen total de 25 µl. Se tratan los ratones cada 1<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> día de la semana durante 5 semanas dando un total de 10 dosis. Al comienzo de la semana 6 se le inyecta a cada ratón el péptido 83-99 en adyuvante completo de Freund (CFA) y también recibe una inyección i.p. de toxina de la tosferina (200 ng) en los días 1 y 3. Se monitoriza la progresión de EAE durante al menos 30 días.

60 Protocolo de desensibilización: se tratan los grupos de ratones mediante administración intranasal de una dosis en escalada de péptido 83-99 o PBS sola en un volumen total de 25 µl. La escalada de dosis comienza a 0,1 µg y avanza hasta 1, 3, 6, 12, 50 y luego tres veces 100 µg. Se tratan los ratones cada 1<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> día de la semana durante 5 semanas dando un total de 10 dosis. Al comienzo de la de semana 6 se le inyecta a cada ratón el péptido 83-99 en el adyuvante completo de Freund (CFA) y también recibe una inyección i.p. de toxina de la tosferina (200 ng) en los días 1 y 3. Se monitoriza la progresión de EAE durante por lo menos 30 días.

Ejemplo 4 - Administración nasal de un cóctel de apítopo a pacientes con EM

5 Se prepara una vacuna que comprende los péptidos MBP 30-44, 83-99, 110-124 y 130-144 (es decir algunos de los epítomos de MBP que se han identificado como apítomos). Se administra la vacuna a treinta y cinco pacientes en un ensayo de fase Ia/Ib. El ensayo es un ensayo cruzado simple en el que los pacientes permanecen sin tratamiento durante tres meses seguido de una dosis única de péptido (Ia). Después se monitorizan los pacientes durante tres meses tras la dosis única de vacuna para evaluar la seguridad. Después el tratamiento consiste en administración dos veces por semana mediante administración intranasal. Para cada paciente: se analiza la actividad clínica mensualmente mediante obtención de imágenes por resonancia magnética; se monitoriza la actividad inmunológica utilizando un ensayo de respuesta cinética para la proliferación; y se monitoriza la producción de citocinas utilizando un ELISA basado en células.

15 El ensayo inicialmente implica el tratamiento de 5 pacientes que padecen enfermedad progresiva crónica (PC). Se seleccionan estos pacientes basándose en actividad MRI baja y en primer lugar se tratan con la dosis más alta de péptidos. Se inicia el tratamiento en el grupo de pacientes con PC porque son los que demuestran con la mayor probabilidad cualquier efecto dañino posible tal como se demuestra mediante un aumento en la actividad MRI. El tratamiento de los pacientes con enfermedad recidiva remitente empieza una vez está claro que el tratamiento de dosis tanto única como múltiple es seguro en el grupo con PC. Se recluta un grupo más grande de 30 pacientes con recaída remitentes basándose en si experimentan lesiones por MRI crecientes durante un periodo de monitorización de 3 meses. Se dividen estos en tres grupos que deben tratarse con una dosis de péptido alta, media o baja.

PUNTO TEMPORAL (MESES)	PACIENTES CON ENFERMEDAD PROGRESIVA CRÓNICA (PC)	PACIENTES CON ENFERMEDAD RECIDIVA REMITENTE (RR)
0	Comienzo de monitorización mensual	
3	Inicio de la fase Ia (dosis única de péptido) con MRI a las 1-2 semanas tras el tratamiento y monitorización mensual	
6	Inicio de la fase Ib (dosis dos veces por semana de péptido) y continuación de la monitorización mensual	Comienzo de monitorización mensual y reclutamiento de pacientes con lesiones crecientes
9		Inicio de la fase Ib (dosis dos veces por semana de péptido) y continuación de la monitorización mensual
12	Fin del tratamiento y continuación de la monitorización mensual durante 6 meses adicionales	
15		Fin del tratamiento y continuación de la monitorización mensual durante 6 meses adicionales

25 Abreviaturas: APC = células presentadoras de antígeno; MHC = complejo mayor de histocompatibilidad; TCR = receptor de células T; EAE = encefalomiелitis autoinmunitaria experimental; APÍTOPO = epítopo independiente de la transformación antigénica; APIPS = sistema de presentación independiente de la transformación antigénica; aa = aminoácido; EM = Esclerosis múltiple; MBP = proteína básica de la mielina; PLP = proteína proteolipídica; TCL = línea de células T; TCC = clon de células T; PBMC = células mononucleares de sangre periférica; PPD = derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis*; PHA = fitohemaglutinina

**Listado de secuencias**

- <110> Universidad de Bristol
- <120> MÉTODO DE SELECCIÓN DE PÉPTIDOS
- <130> P9611WO LCH
- <140> Documento PCT/GB01/03702
- <141> 17-8-2.001
- <150> Documento 0020618.5
- <151> 21-8-2.008
- <160> 11
- <170> PatentInversion 3.0
- <210> 1
- <211> 17

ES 2 439 899 T3

<212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr  
 1 5 10 15

Pro

5 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val  
 1 5 10 15

10 <210> 3  
 <211> 15  
 <212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 3

Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr  
 1 5 10 15

<210> 4  
 <211> 15  
 <212> PROTEÍNA  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 15  
 25 <212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg  
 1 5 10 15

<210> 6  
 30 <211> 15  
 <212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Met Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr  
 1 5 10 15

35 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val  
 1 5 10 15

40 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PROTEÍNA  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 8

Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp  
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PROTEÍNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala  
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

10 <212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln  
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 13

15 <212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para seleccionar un péptido que es útil en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de hipersensibilidad mediado por células T que reconocen el antígeno diana, que comprende las siguientes etapas:
- 5 (i) tratar un sistema de presentación de antígenos libre de transformación con una pluralidad de péptidos comprendiendo cada uno un epítipo de células T del antígeno diana;
- (ii) analizar unión de los péptidos a moléculas del MHC de clase I o de clase II en el sistema añadiendo células T y midiendo activación de células T;
- 10 (iii) identificar un péptido que es capaz de unir una molécula del MHC de clase I o de clase II en el sistema de presentación de antígenos libre de transformación y que se presenta a una célula T como siendo un péptido capaz de inducir tolerancia al antígeno diana *in vivo* cuando se administra a un sujeto, que es útil en la prevención y/o el tratamiento del trastorno de hipersensibilidad; y
- 15 (iv) seleccionar un péptido que se identifica como que es capaz de unir una molécula del MHC de clase I o de clase II en el sistema de presentación de antígenos libre de transformación y que se presenta a una célula T en la etapa (iii).
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema de presentación de antígenos comprende:
- (i) células presentadoras de antígeno fijadas;
- 25 (ii) membranas lipídicas que comprenden moléculas del MHC de clase I o de clase II; o
- (iii) moléculas del MHC de clase I o de clase II unidas a placa.
3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la etapa de investigar si el péptido es capaz de unión a una molécula del MHC de clase II en el sistema de presentación libre de transformación y que se presenta a una célula T.
- 30 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la pluralidad de péptidos se eluye a partir de las moléculas del MHC de clase II de una célula presentadora de antígeno.
- 35 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido se selecciona a partir de un conjunto jerarquizado de péptidos truncados.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la presencia de un epítipo de células T en el péptido se determina por:
- 40 (i) tratar:
- una muestra de células de un sujeto que tiene la enfermedad, y
- 45 una muestra de células de un sujeto que no tiene la enfermedad con el péptido; y
- (ii) comparar las respuestas de células T entre las muestras celulares.
- 50 7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el trastorno de hipersensibilidad es alergia, enfermedad autoinmunitaria o rechazo de injerto.

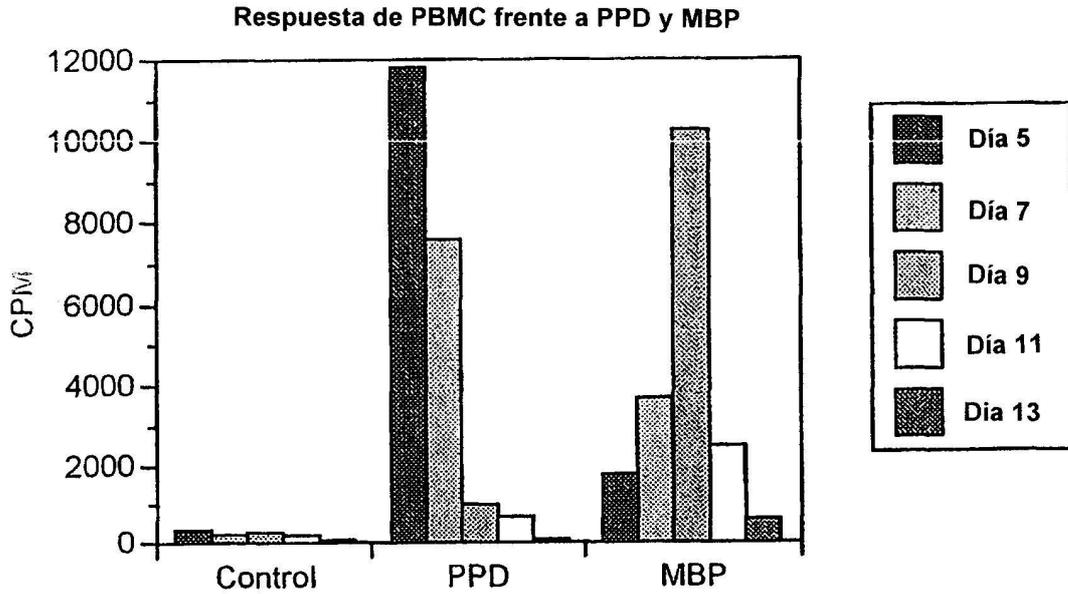


FIG. 1A

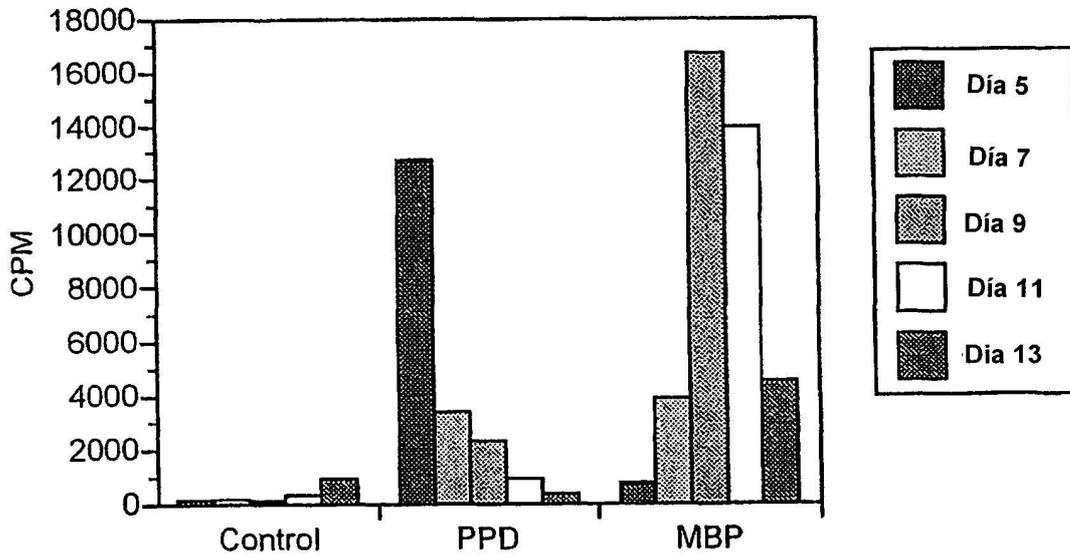


FIG. 1B

Respuesta frente a péptidos MBP en pacientes con EM: 1 <sup>er</sup> punto de tiempo												
	MBP de 1 a 24 15-39 30-54 45-69 60-84 75-99 90-114 105-129 120-144 135-159 150-170											
EM 10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
EM 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 39	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
EM 41	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
EM 43	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
EM 49	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
EM 57	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 59	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
EM 60	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
EM 67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
EM 80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Respuesta frente a péptidos MBP en pacientes con EM: 2 <sup>o</sup> punto de tiempo												
EM 10	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
EM 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EM 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 49	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
EM 57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 60	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EM 43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respuesta frente a péptidos MBP en pacientes con EM: 3 <sup>er</sup> punto de tiempo												
EM 41	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
EM 60	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
EM 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

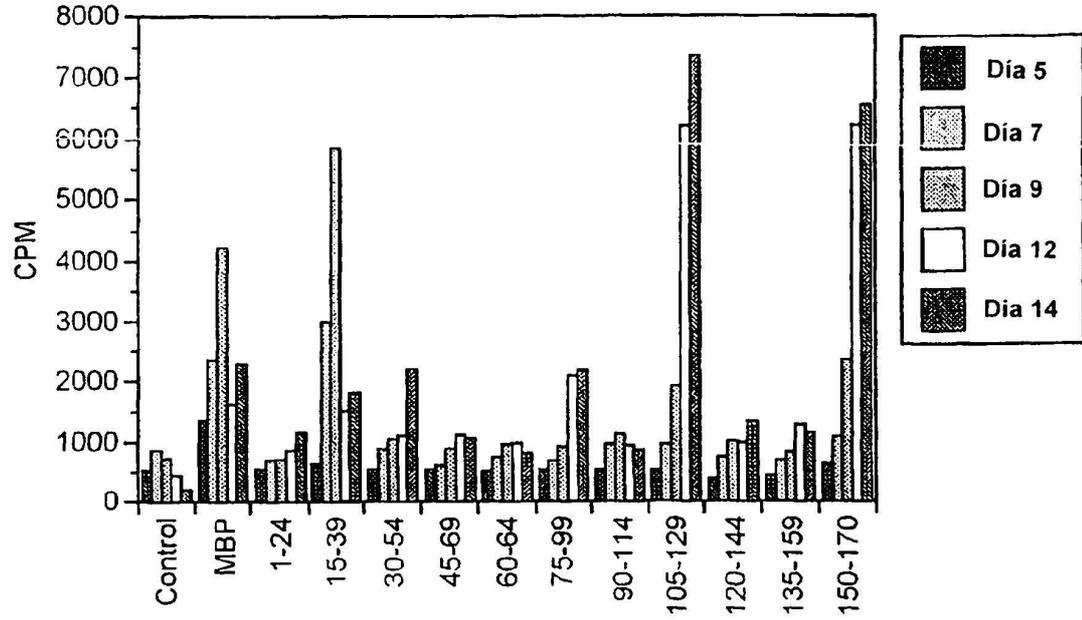
FIG. 2

Respuesta frente a péptidos MBP en individuos sanos: 1 <sup>er</sup> punto de tiempo												
Individuo	MBP	de 1 a 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-17
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Respuesta frente a péptidos MBP en individuos sanos: 2 <sup>o</sup> punto de tiempo												
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Respuesta frente a péptidos MBP en individuos sanos: 3 <sup>er</sup> punto de tiempo												
D	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
F	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

FIG. 3

1<sup>er</sup> punto de tiempo

EM 49: respuesta de PBMC frente a péptidos MBP



2<sup>o</sup> punto de tiempo

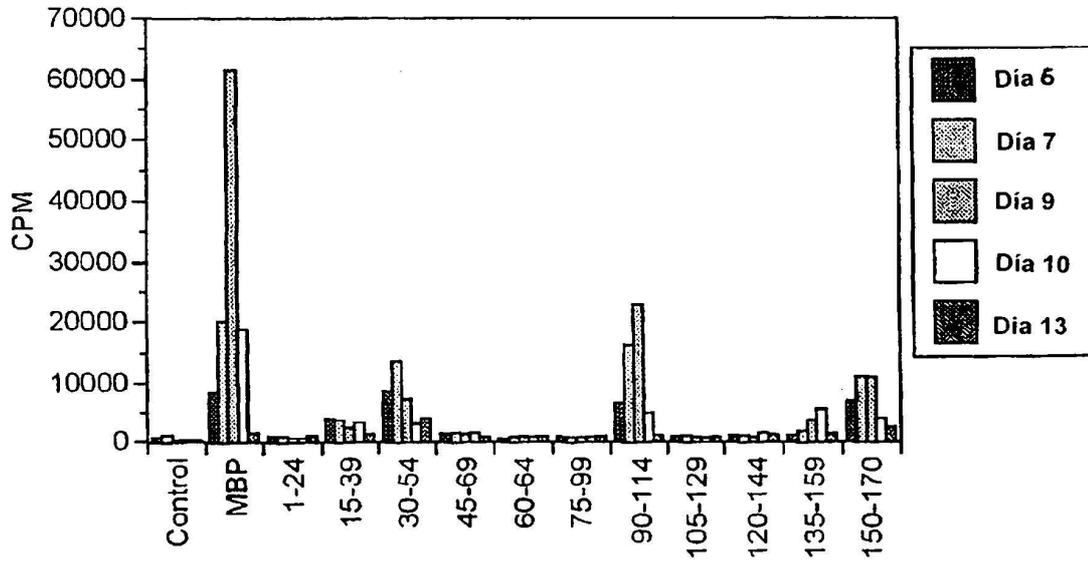


FIG. 4

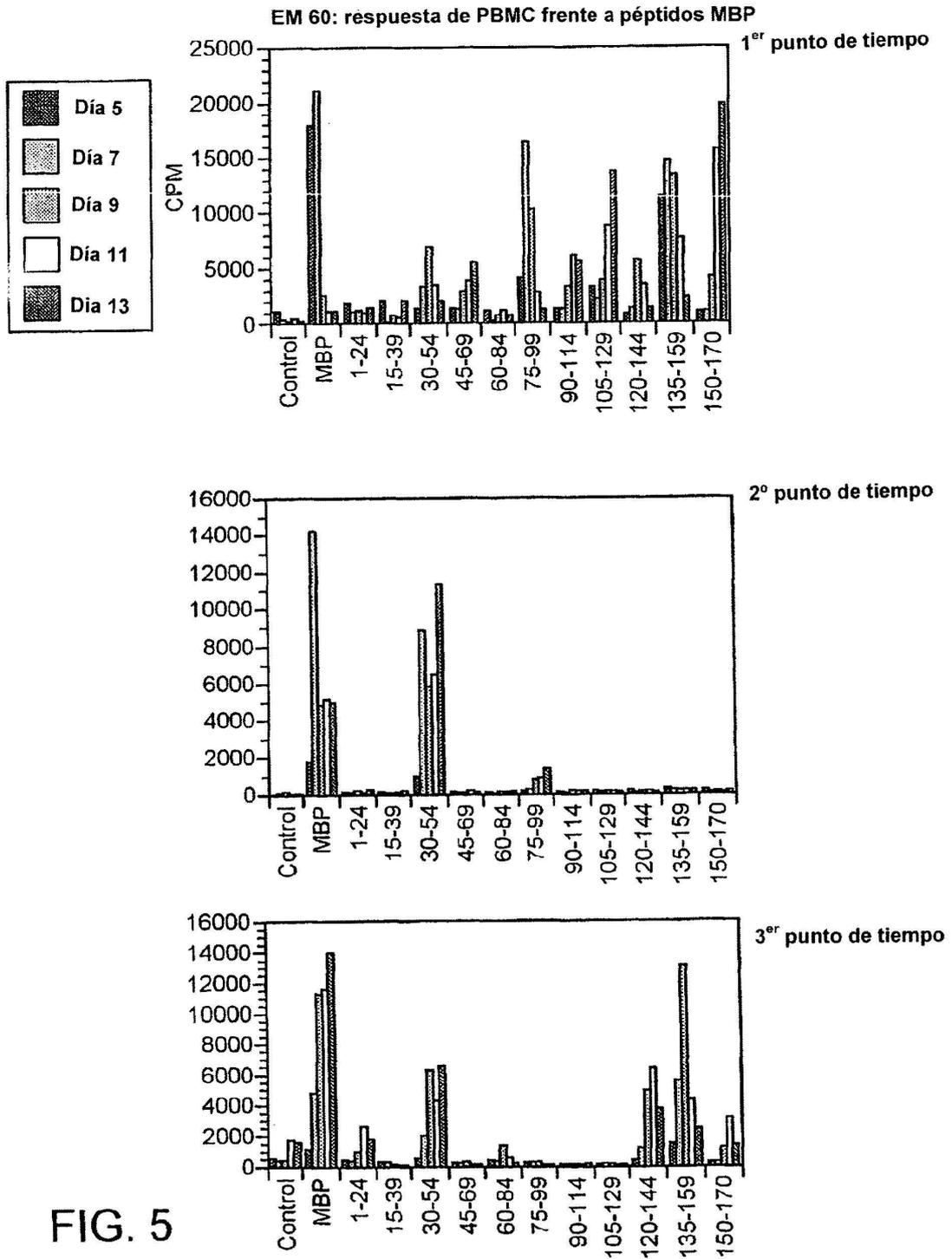


FIG. 5

TCC	región de MBP	Péptido específico
MS 39 : A7*	1-24	5-19
EM 49 : D3*	30-54	30-44
EM 49 : C8*	30-54	30-44
EM 49 : A8*	30-54	30-44
EM 48 : B6*	30-54	30-44
EM 39 : D7*	60-84	60-74
EM 43 : A7*	75-99	83-99
EM 41 : B6*	75-99	83-99
EM 41 : A2*	75-99	83-99
EM 41 : C6*	75-99	83-99
N5 : 8**	75-99	83-99
EM 60 : A2*	105-129	110-124
EM 60 : B3*	105-129	110-124
EM 60 : E1*	120-144	130-144
EM 17 : A3*	120-144	130-144
EM 60 : F7*	135-159	140-154
EM 60 : D1*	135-159	140-154
EM 57 : A1*	135-159	140-154
EM 59 : F1*	135-159	140-154
N5 : 19**	135-159	140-154
EM 43 : A3*	150-170	156-169
EM 43 : D2*	150-170	156-169

FIG. 6

REGIÓN DE PROTEÍNA ESTUDIADA	EPÍTOPOS IDENTIFICADOS UTILIZANDO CLONES DE CÉLULAS T
1-24	5-19
15-39	No comunes
30-54	30-44
45-69	No comunes
60-84	60-74
75-99	80-94 83-99
90-114	No comunes
105-29	110-124
120-144	130-144
135-159	130-144 140-154
150-170	150-164 156-169

FIG. 7A

EPÍTOPO ESTUDIADO	APÍTOPO ESTUDIADO
5-19	No realizado
30-44	++
60-74	No realizado
80-94	++
83-99	++
110-124	++
130-144	++
140-154	No realizado
156-170	-

FIG. 7B

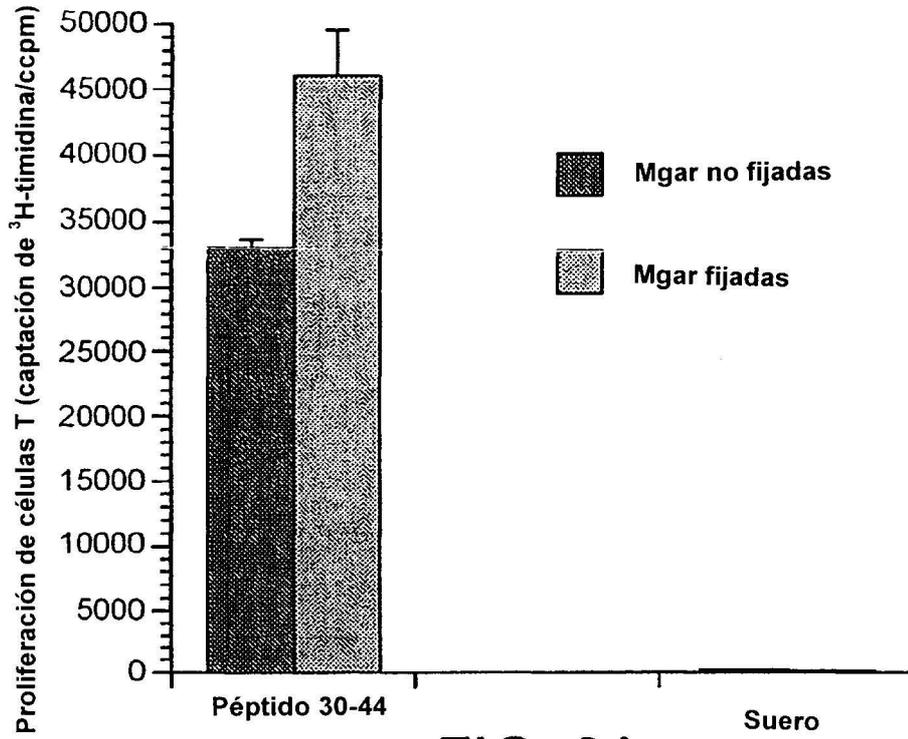


FIG. 8A

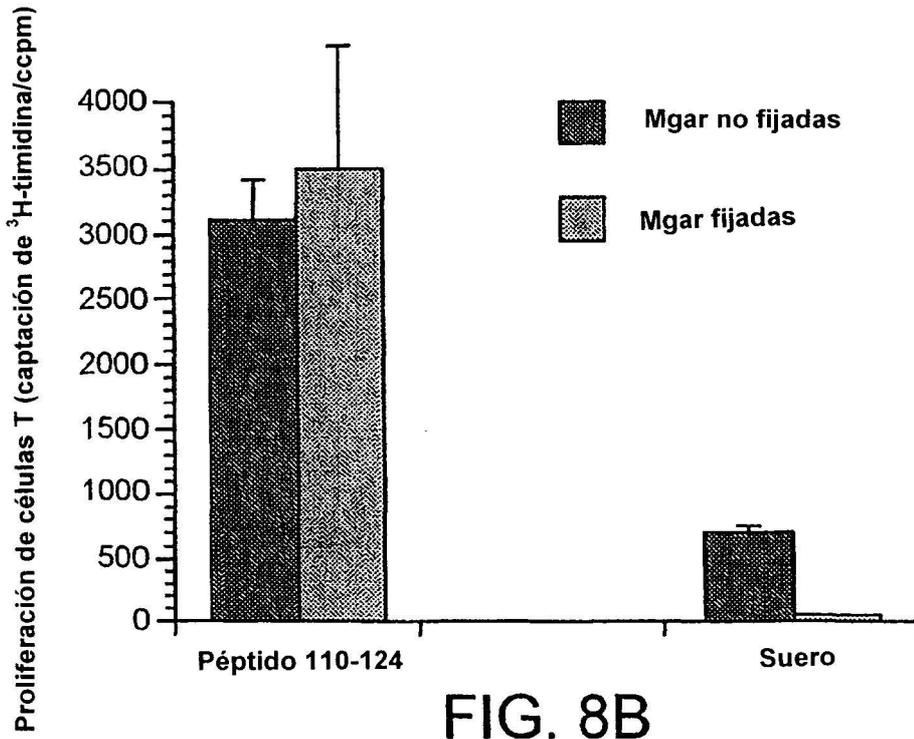


FIG. 8B

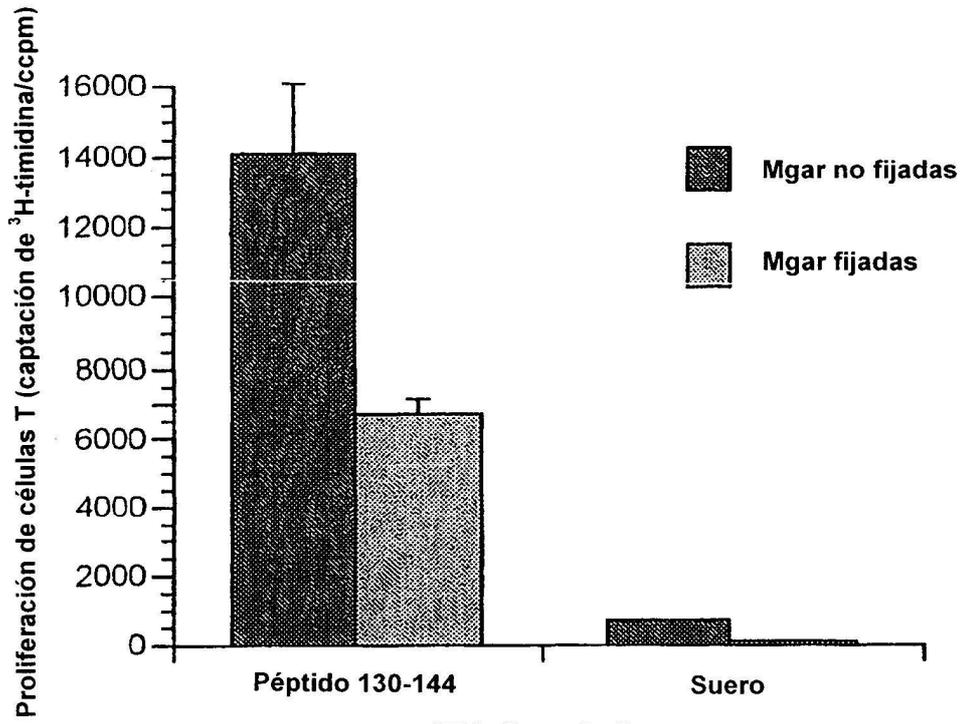


FIG. 9A

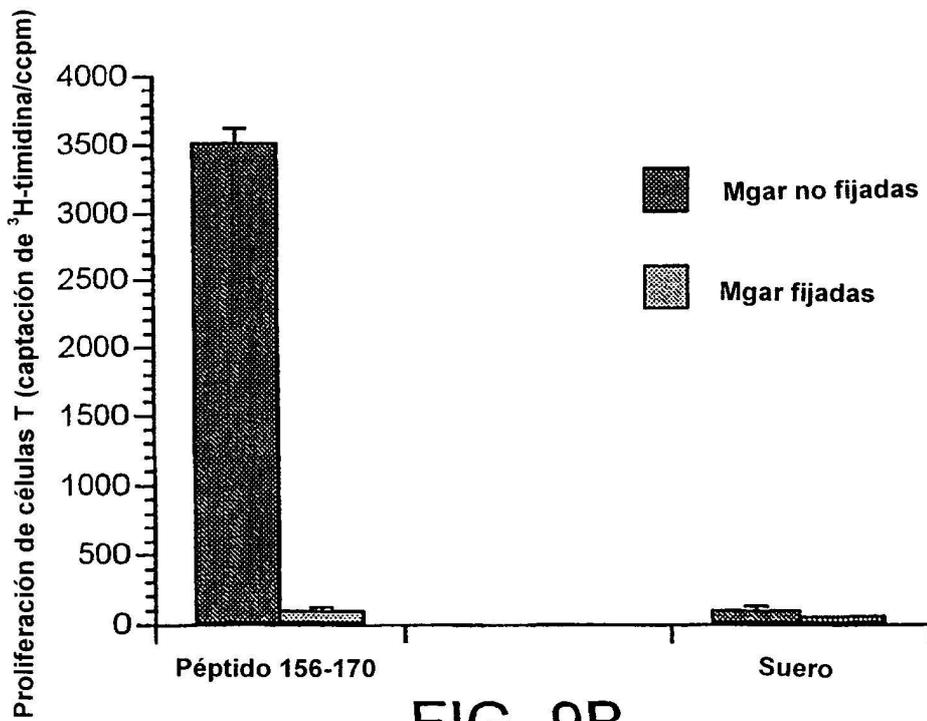


FIG. 9B

	Punto de tiempo	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
EM 10	1	14	17	3	15	55	1	1	2	15	1	2	1
	2	4	1	<1	<1	<1	<1	9	4	1	<1	4	1
	3	8	3	1	1	1	<1	1	1	2	1	1	0
EM 17	1	29	1	1	1	1,5	2	1	<1	1	1	1,5	2
	2	51	1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	5
	3	51	1	<1	2	1	1	<1	2	1	1	1	1
EM 19	1	1	2	1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1,5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
EM 39	1	39	3	5	1	3	2	2	7,5	6	<1	2	2
	2	58	1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	<1
	3	50	8	1	1	1	2	1	1,5	1	<1	3	<1
EM 41	1	59	2	3	2	2	1,5	1	1	2	6	7	3
	2	116	<1	1	<1	<1	<1	1	<1	1	<1	<1	<1
	3	74	2	1,5	1	2	2	8	<1	<1	<1	95	<1
EM 43	1	32	4	22	3	3	3	24	4	2	12	3	4
	2	75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	66	2	2	1	13	2	1	2	2	2	7	1
EM 49	1	6	5	9	11	5	4	11	4	35	6	5	31
	2	202	2	8	23	4	3	2	73	2	2	11	34
	3	2	1	2	4	1	2	1	1	1	1	1	2
EM 57	1	36	8	<1	1,5	1	1	2	2	<1	<1	<1	<1
	2	7	2	2	2	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
EM 59	1	57	2	1	65	1	1	9	37	1	1	2	14
	2	27	1	<1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	14	1	9	2	1	1	4	2	2	63	137	1
EM 60	1	44	3	2	19	8	2	28	9	11	16	16	12
	2	133	1	<1	83	<1	<1	20	<1	1	<1	2	<1
	3	23	2	<1	13	<1	2	<1	<1	<1	10	26	2
EM 67	1	49	2	2	1	2	2	1	<1	1	1	1	58

FIG. 10

	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
N1	20	<1	<1	<1	<1	0	1	<1	1	<1	<1	<1
N2	54	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
N3	14	2	2	2	1	4	6	1	1	<1	2	3
N4	6	1	1,5	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	1	<1
N5	27	<1	1,5	<1	<1	<1	1,5	1	<1	<1	1	<1
N6	29	5	1	1	3	2	5	6	<1	2	3	2
N7	100	2	<1	2	<1	<1	<1	<1	2	<1	2	2
N8	33	3	<1	1,5	<1	<1	1	1	1	1	2,5	1,5
N9	104	<1	<1	2	<1	1	1	<1	1	2	1	<1
N10	72	3	<1	1	<1	2	1,5	<1	<1	71	5	<1
N11	11	4	1	18	<1	12	5	<1	2	7	7	8
N12	89	1	<1	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	<1	<1

FIG. 11

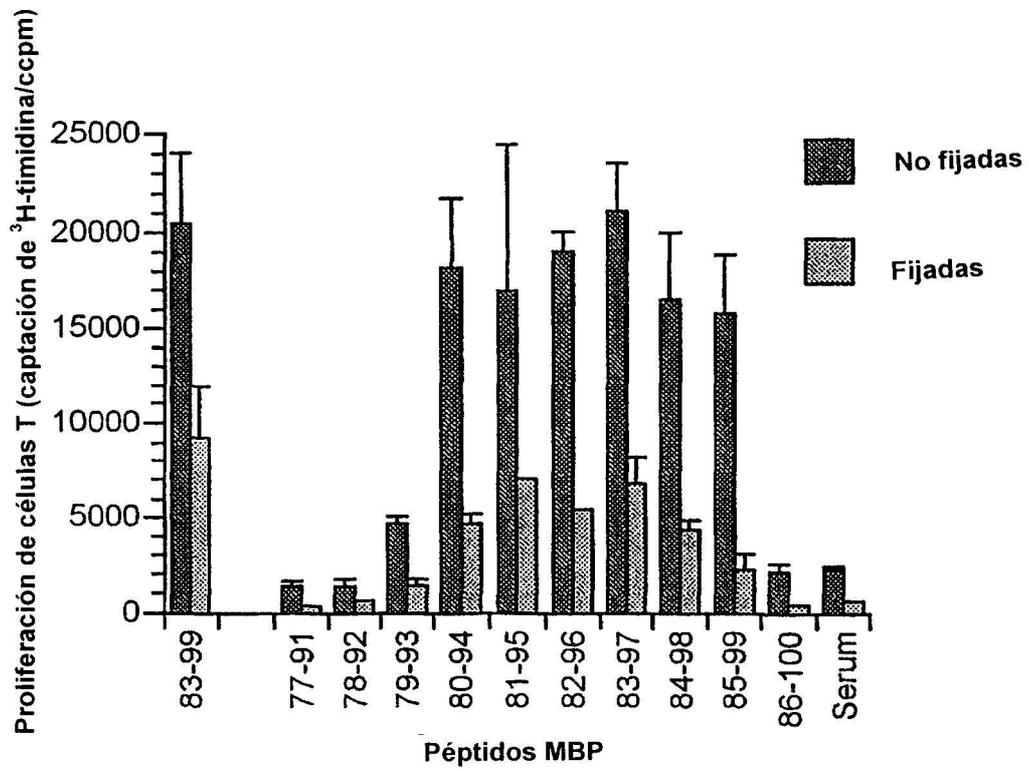
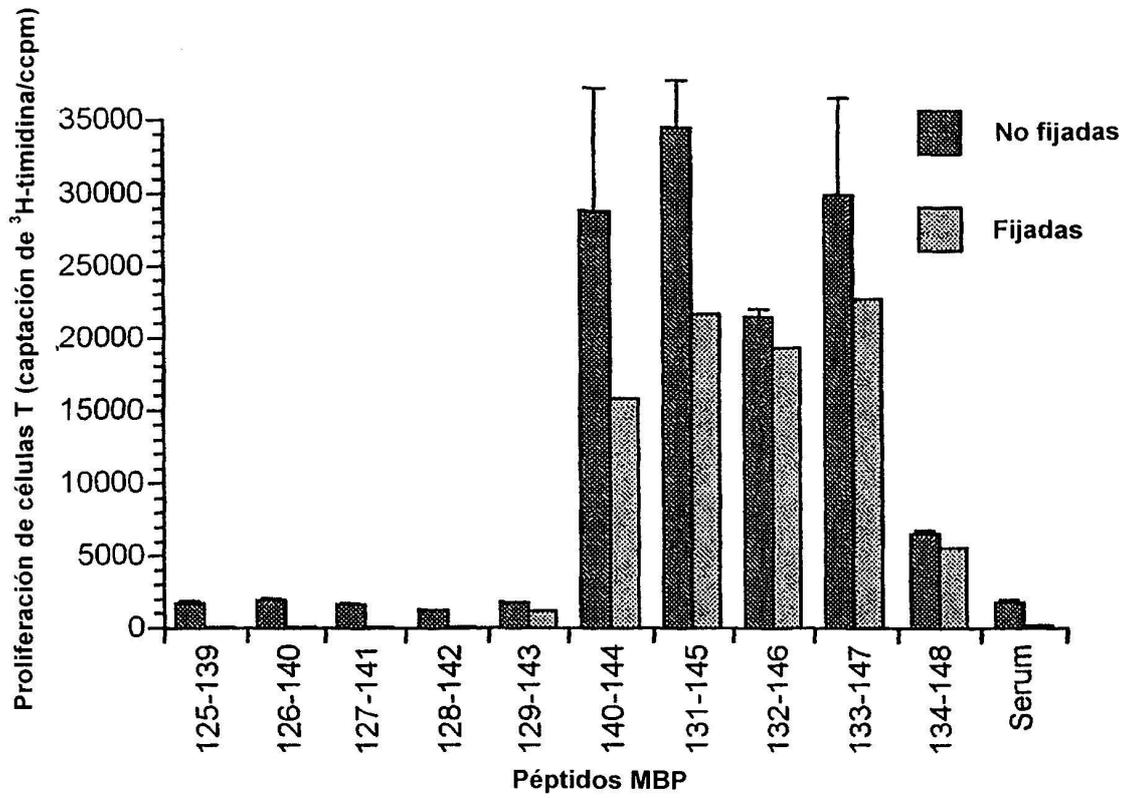


FIG. 12



**FIG. 13**

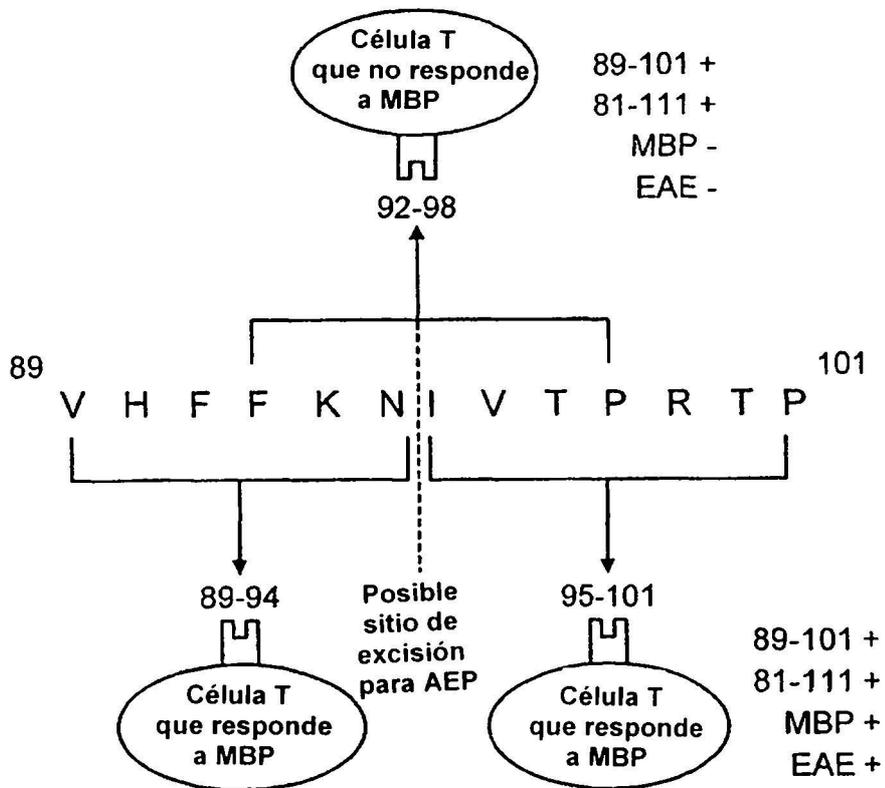


FIG. 14

Símbolo	Péptido intraperitoneal	Péptido para sensibiliz.	Péptido para mem. in vitro
□	Ninguno	87-96	87-96
○	Ninguno	87-96	89-101
■	87-96	87-96	87-96
●	87-96	87-96	89-101

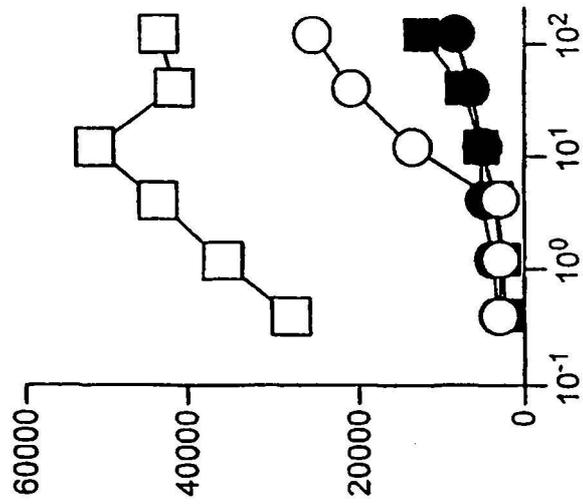


FIG. 15A

Simbolo	Péptido intraperitoneal	Péptido para sensibiliz.	Péptido para mem. in vitro
□	Ninguno	87-96	87-96
○	Ninguno	87-96	89-101
■	89-101	87-96	87-96
●	89-101	87-96	89-101

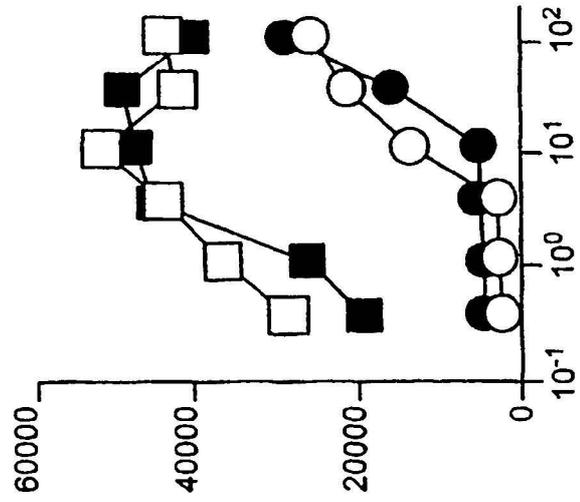


FIG. 15B