

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 185**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2000** **E 08006581 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 1986011**

54 Título: **Epítomos peptídicos reconocidos por linfocitos T CD4+ estimulados por enfermedad**

30 Prioridad:

21.04.1999 US 295868
21.04.1999 US 130355 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.05.2015

73 Titular/es:

EISAI INC. (50.0%)
100 Tice Boulevard
Woodcliff Lake, NJ 07677, US y
KING'S COLLEGE LONDON (50.0%)

72 Inventor/es:

PEAKMAN, MARK y
CHICZ, ROMAN M.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 536 185 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

Epítomos peptídicos reconocidos por linfocitos T CD4+ estimulados por enfermedad

Antecedentes de la invención

La invención pertenece al campo de las enfermedades con etiología inmunológica, en particular enfermedades que implican a los linfocitos T CD4+.

Tras la internalización y procesamiento proteolítico de antígenos proteicos intactos por las células presentadoras de antígenos (CPA), las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II sobre las CPA se unen a péptidos antigénicos cortos (epítomos) derivados de los antígenos y presentan los péptidos unidos a los linfocitos T CD4+ [Germain, R.N. (1994), Cell 76:287 - 299]. Los genes del MHC de clase II y las moléculas que codifican son muy variables entre individuos y las diferencias entre las moléculas del MHC de clase II tienen profundos efectos sobre qué péptidos se seleccionan para su presentación como epítomos de los linfocitos T. Las diferentes formas (alelos) de las moléculas del MHC de clase II expresadas por un individuo tienen un efecto fundamental sobre la susceptibilidad del individuo a una serie de enfermedades mediadas por los linfocitos T CD4+, de forma muy destacada enfermedades autoinmunes tales como la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) [Davies y col. (1994), Nature 371:130 - 136]. Es importante que los epítomos antigénicos de los antígenos reconocidos por los linfocitos T CD4+ que participan en estas enfermedades se definan con el fin de desarrollar productos y protocolos profilácticos y/o terapéuticos eficaces.

Honeyman et al., (Molecular Medicine, 4 231 - 239, 1998) y Lohmann et al., (Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 107, 166 - 171, 1999) divulgan una serie de péptidos IA-2 que provocan respuestas inmunológicas más débiles en pacientes en comparación con los péptidos de la presente invención.

Sumario de la invención

La invención presenta epítomos peptídicos que activan las respuestas de los linfocitos T CD4 + que participan en la iniciación, promoción o exacerbación de ciertas enfermedades, especialmente aquellas en las que la susceptibilidad viene determinada por la expresión de moléculas de MHC de clase II definidas. La invención se basa en el descubrimiento de que la unión artificial de una molécula polipeptídica a la membrana celular de una CPA facilita el transporte de la molécula a los orgánulos que procesan el antígeno de la CPA. La invención está dirigida a péptidos derivados del autoantígeno de la diabetes IA-2.

La invención es un péptido aislado que se une a HLA-DR4, que consiste en la secuencia de aminoácidos:

(1) YLKNVQTQETRTL (SEC ID N° 10);

(2) YLKNVQTQETRTLTLQ (SEC ID N° 13); o

(3) FYLKNVQTQETRTLTLQFHF (SEC ID N° 16).

La invención también incluye un péptido aislado que se une a HLA-DR4, que consiste en la secuencia de aminoácidos:

(1) AYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 17);

(2) LAKEWQALCAYQAEPNT (SEC ID N° 19);

(3) AYQAEPNTCATAQGEGNIK (SEC ID N° 20);

(4) WQALCAYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 21); o

(5) LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (SEC ID N° 22).

La invención también incluye un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos KLKVESSPSRSDYINAS (SEC ID N° 40).

La invención también incluye un procedimiento de protección de un sujeto de la DMDI o los síntomas patogénicos de la DMDI. Se entiende que protección incluye el alivio (o disminución), así como la eliminación de los síntomas patógenos en un sujeto. El procedimiento incluye la administración al sujeto de cualquiera de los péptidos anteriores de la invención por cualquiera de las vías divulgadas en el presente documento.

Otra realización de la invención es un procedimiento de diagnóstico de la DMDI que comprende: (a) proporcionar linfocitos CD4 de un individuo sospechoso de tener o de ser susceptible a la DMDI; (b) proporcionar una población de CPA que llevan en su superficie una molécula de MHC de clase II de un alelo idéntico a uno expresado por el individuo, habiendo estado en contacto la población de CPA con un péptido IA-2 y estando la molécula de MHC de

clase II de las CPA unida al péptido IA-2; (c) poner en contacto la población de las CPA de (b) con los linfocitos CD4 de (a); y (d) determinar si los linfocitos CD4 reconocen el péptido unido al MHC de clase, como indicación de que el individuo tiene o es susceptible a tener DMDI. El péptido IA-2 utilizado en el procedimiento tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: YLKNVQTQETRTL (SEC ID N° 10); YLKNVQTQETRTLQ (SEC ID N° 13); FYLKNVQTQETRTLQFHF (SEC ID N° 16); AYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 17); LAKEWQALCAYQAEPNT (SEC ID N° 19); AYQAEPNTCATAQGEGNIK (SEC ID N° 20); WQALCAYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 21); LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (SEC ID N° 22); y KLKVESSPSRSDYINAS (SEC ID N° 40).

Un péptido "aislado" de la invención es un péptido que, o bien no tiene homólogo de origen natural (por ejemplo, tal como un APL) o se ha separado o purificado a partir de componentes que lo acompañan de forma natural, por ejemplo, en tejidos tales como el páncreas, el hígado, el bazo, los ovarios, los testículos, el músculo, el tejido articular, el tejido nervioso, el tejido gastrointestinal o los fluidos corporales tales como sangre, suero, u orina. Típicamente, el péptido se considera "aislado" cuando carece de al menos 70 %, en peso seco, de las proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que está asociado de forma natural. Preferentemente, una preparación de un péptido de la invención es al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, y más preferentemente al menos 99 %, en peso seco, el péptido de la invención. Por tanto, por ejemplo, una preparación del péptido x es al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, y más preferentemente al menos 99 %, en peso seco, el péptido x. Dado que un péptido que se sintetiza químicamente está, por su naturaleza, separado de los componentes que lo acompañan de forma natural, el péptido sintético está "aislado".

Un péptido aislado de la invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural (por ejemplo, a partir de tejidos humanos o fluidos corporales); mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el péptido; o mediante síntesis química. Un péptido que se produce en un sistema celular diferente de la fuente de la que procede de forma está "aislado", ya que estará separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. El grado de aislamiento o pureza puede medirse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis de HPLC.

Como se usa en el presente documento, "protección contra una enfermedad de mamífero" significa la prevención de la aparición de una enfermedad de mamífero o disminución de la gravedad de una enfermedad existente en un mamífero. "Prevención" puede incluir un retraso de la aparición, así como un bloqueo parcial o completo en el progreso de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, "un fragmento peptídico procesado de forma natural asociado a la diabetes" es un fragmento peptídico producido por la degradación proteolítica de una proteína (por ejemplo, insulina, proinsulina, preproinsulina, IA-2, IA-2 β , o GAD65) en una célula presentadora de antígeno de un mamífero. El reconocimiento de dicho péptido por los linfocitos T CD4 de un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) es indicativo de la existencia, o de la futura aparición, de la diabetes en el mamífero.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. En caso de conflicto, el presente documento, incluidas las definiciones, tendrá prioridad. A continuación se describen procedimientos y materiales preferidos, aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la el presente documento. A menos que se indique lo contrario, estos materiales y procedimientos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento son sólo ilustrativas y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción, de las figuras y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un histograma que muestra los perfiles de citometría de flujo activada por fluorescencia de células Priess que se tiñeron con anticuerpo de conejo específico del toxoide del tétanos y el anticuerpo de cabra específico de inmunoglobulina de conejo conjugado con FITC en diversos momentos después de ser sometido al Sistema de Liberación de Antígenos (SLA) usando el toxoide del tétanos como el antígeno polipeptídico.

La Fig. 2 es un diagrama que muestra 2 espectros MALDI-TOF alineados adecuadamente derivados de 2 mezclas de péptidos obtenidos mediante procedimientos IMF en los que alícuotas separadas de células de Priess se trataron con todas las etapas del procedimiento de Huellas Digitales de masa Inmunológica (FMI), incluyendo la exposición a IA 2ic biotinilado o todas las etapas del procedimiento IMF, excepto la exposición a IA 2ic biotinilado.

La Fig. 3 es una serie de gráficos de líneas que muestran la capacidad relativa de 6 péptidos (con secuencias de aminoácidos basadas en las 6 regiones centrales de IA-2 identificadas por IMF) para inhibir la unión de un péptido de cadena invariante (Ii) a moléculas aisladas de HLA DR4.

Descripción detallada

La presente invención se basa en el nuevo descubrimiento de que, mediante la unión artificial de un polipéptido de interés (PPI) a la membrana celular de una CPA, la CPA transportará el PPI a uno de los orgánulos de procesamiento de antígeno dentro de la célula, por ejemplo, endosomas, lisosomas y estructuras designadas "compartimentos de MHC de clase II" (MIIC) que tienen características lisosomales y están enriquecidas en moléculas de MHC de clase II pero que están sustancialmente desprovistas de moléculas de MHC de clase I [Peter y col.(1991), Nature 349:669 - 676]. Después, el PPI se degrada mediante enzimas proteolíticas en fragmentos peptídicos. Si cualquiera de estos fragmentos peptídicos tiene la capacidad de unirse a una de las moléculas de MHC de clase II expresadas por el individuo del que se derivó la CPA, lo hará en el orgánulo de procesamiento de antígenos. A continuación, el complejo molécula del MHC de clase II-péptido se transporta a la membrana celular, donde se convierte en disponible para la interacción con los linfocitos T CD4 + portadores de receptores específicos de antígeno que reconocen específicamente dicho complejo de MHC de clase II – péptido. Eluyendo los péptidos de las moléculas de MHC de clase II aisladas a partir de estas CPA, se obtiene un conjunto de péptidos procesados naturalmente derivados de la PPI, así como de otros polipéptidos de origen intracelular o extracelular. Los péptidos, que son específicos de las moléculas MHC de clase II concretas expresadas por las CPA, se separan químicamente y sus secuencias de aminoácidos se determinan. Por comparación de las secuencias de aminoácidos del péptido con la secuencia del PPI es posible identificar aquellas que derivan de PPI. Por lo tanto, el descubrimiento proporciona un procedimiento de identificación de fragmentos peptídicos que son procesados de forma natural por las CPA y que tienen afinidad de unión intrínseca por la molécula de MHC de clase II relevante. El procedimiento puede ser muy valioso para la identificación de péptidos derivados de un polipéptido sospechoso de ser un antígeno que activa los linfocitos T CD4 + que intervienen en cualquiera de (a) la patogenia (patología) de una enfermedad, especialmente uno en el que la susceptibilidad o la protección se asocia con la expresión de un tipo particular de molécula de MHC de clase II, o (b) prevención o reducción de los síntomas de una enfermedad, especialmente una en la que la protección o la reducción de la gravedad se asocian con la expresión de un tipo particular de molécula de MHC de clase II. El procedimiento se denomina "Huellas dactilares de masa inmunológica".

El procedimiento descrito asegura que los péptidos identificados son aquellos que (i) se procesan de forma natural in vivo por la ACPA, y (ii) se asocian, en la CPA, con las moléculas de de MHC de clase II pertinentes.

Además, el presente procedimiento controla para el MHC de clase II, un aspecto importante esencial para vincular cualquier péptido dado con una enfermedad concreta mediada por los linfocitos T CD4 + en un individuo dado, pero especialmente importante en trastornos en los que el tipo de MHC de clase II determina la susceptibilidad a la enfermedad o la resistencia.

Cualquier péptido procesado de forma natural con una secuencia que corresponde a un fragmento de la PPI, y que se une a una molécula de MHC de clase II asociada con la enfermedad de interés, podría ser un péptido que activa los linfocitos T CD4 + que, inician, estimulan, exacerbaban la enfermedad o median la inmunidad a ella. Para obtener evidencia confirmatoria de esta posibilidad, los ensayos de linfocitos T CD4 + de sujetos que expresan las moléculas de MHC de clase II pertinentes pueden analizarse para determinar la capacidad de respuesta a un péptido. Los linfocitos T CD4 + de control pueden ser de sujetos que también expresan la molécula de MHC de clase II, pero sin síntomas de la enfermedad. Una respuesta significativa de los linfocitos T CD4 + de prueba y ausencia de respuesta de los linfocitos T CD4 + de control indicaría que el péptido relevante está involucrado en el proceso de la enfermedad (patología de la enfermedad) o en la inmunidad a la enfermedad. La fase de respuesta celular del procedimiento se denomina "Verificación del Epítipo" ("VE").

Mediante la aplicación de los procedimientos a la porción intracelular del autoantígeno IA-2 de la diabetes, los péptidos derivados de IA-2 se identificaron como epítomos que podrían estar involucrados en la patogenia de la diabetes en pacientes de DMDI humanos que expresan el alelo del MHC de clase II DR4. Sobre la base de sus secuencias de aminoácidos, estos péptidos entran en 6 grupos anidados. Un péptido consenso correspondiente a las regiones centrales de cada grupo anidado se sintetizó y se analizó para determinar su capacidad para activar los linfocitos T CD4 + de los pacientes de DMDI que expresan DR4 o sujetos sin síntomas de la enfermedad que expresan DR4. Se detectaron respuestas significativas a al menos 1 de los 6 péptidos en los linfocitos de sangre periférica de 9/13 pacientes de DMDI que expresan DR4. Los linfocitos T de ninguno de los sujetos de control respondieron a cualquiera de los péptidos y los linfocitos T de 1 de 8 pacientes de DMDI que expresan DR4 respondieron a cualquier péptido. Estos hallazgos sugieren que los 6 péptidos a los que respondieron los pacientes con DMDI que expresan DR4 representan epítomos principales capaces de unirse a moléculas de DR4 y activar los linfocitos T CD4 + diabetogénicos en pacientes de DMDI. La capacidad de los 6 péptidos para unirse a moléculas de DR4 aisladas se confirmó en un ensayo de unión *in vitro*.

Los procedimientos se pueden aplicar a la identificación de péptidos implicados en la patogenia de o la protección frente a cualquiera de una amplia gama de enfermedades, especialmente aquellas en las que la susceptibilidad o resistencia relativa se ha asociado con la expresión de un alelo de MHC de clase II concreto, siempre que la secuencia de aminoácidos (o la secuencia de aminoácidos parcial) de un antígeno polipéptido sospechoso está disponible. Las enfermedades candidatas incluyen, sin limitación, enfermedades infecciosas (por ejemplo,

enfermedades causadas por *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, virus del sarampión, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana y *Plasmodium falciparum*), cáncer (por ejemplo, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de colon y linfomas de células B) [Topalian, S.L. (1994), Curr. Opin. Immunol. 6: 741 - 745; Topalian y col.(1996), J. Exp. Med. 183: 1965 - 1971], y enfermedades autoinmunes (por ejemplo, DMDI, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave y lupus eritematoso sistémico).

La invención incluye péptidos específicos derivados de IA-2 utilizando el procedimiento anterior, tal como se describe en el Ejemplo 1.

1. Procedimientos de identificación de linfocitos T CD4 + que activan epítomos peptídicos derivados de antígenos polipeptídicos

Los procedimientos tienen dos fases distintas. La primera se denomina "Huellas Digital de la Masa Inmunológica" (IMFI) y la segunda la "Verificación del epítipo" (VE). La finalidad de la IMF es dirigir un polipéptido candidato a uno cualquiera de los compartimentos de procesamiento de antígeno de una CPA donde pueden degradarse a fragmentos peptídicos. Cualquier péptido de la longitud apropiada (de aproximadamente 9 a 25 restos de aminoácidos) y que tienen afinidad de unión específica por una molécula de MHC de clase II concreta expresada por la CPA, se unirá a dicha molécula de MHC de clase II en los compartimentos de procesamiento de antígeno. La mayoría de estos complejos de molécula de MHC de clase II-péptidos migran a la membrana celular de la CPA. Los complejos (tanto asociados a la membrana celular como intracelulares) se aíslan de la CPA y los péptidos eluyen de los complejos. Los péptidos eluidos se separan a continuación, sus secuencias de aminoácidos se determinan y las secuencias se comparan con la del polipéptido candidato.

La IMF generalmente se puede aplicar al análisis de péptidos producidos por una CPA que expresan moléculas de MHC de clase II definidas. Como tal, el procedimiento puede ser útil para estudios de investigación básica, por ejemplo, estudios dirigidos a identificar restos de aminoácidos en un polipéptido que determinan los sitios de "corte" de las enzimas proteolíticas de procesamiento de antígenos de las CPA. Como alternativa, cuando se sospecha que el polipéptido es un antígeno que activa los linfocitos T CD4 + que causan o promueven una enfermedad particular o median en la protección de una enfermedad, el IMF puede usarse para identificar los epítomos peptídicos relacionados con la enfermedad o protectores derivados del polipéptido. Esta información podría ser útil para la investigación básica en la etiología de la enfermedad, o como base para el desarrollo de diagnósticos, terapéuticas o vacunas para la enfermedad.

Un péptido cuya secuencia de aminoácidos coincide con la de una región del polipéptido candidato es probable que sea uno que active las los linfocitos T CD4 + que intervienen en la patogenia o la inmunidad frente a la enfermedad en cuestión. Dicho péptido se puede someter al procedimiento de VE en el que se analiza su capacidad para activar los linfocitos T CD4 + de los sujetos de ensayo y de control. Los péptidos que activan los linfocitos T CD4+ De los sujetos de ensayo, pero no los de los sujetos control se identifican como péptidos que pueden iniciar, promover o agravar la enfermedad en cuestión o mediar en la protección contra la enfermedad o sus síntomas patógenos.

Una vez que dicho péptido se identifica, se puede sintetizar en grandes cantidades, mediante técnicas químicas o recombinantes, y se usa en ensayos de diagnóstico similares a los procedimientos VE QUE se indican a continuación. Los péptidos relevantes pueden usarse solos o en combinación. Alternativamente, los vectores de expresión que codifican un péptido tal o una combinación de tales péptidos pueden utilizarse para transfectar o transducir la CPA adecuada (véase más adelante), y estos pueden usarse en ensayos de diagnóstico similares.

Además, multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros o) de una molécula de MHC de clase II que contiene un péptido definido por el procedimiento, si se conjuga con un marcador detectable (por ejemplo, un resto fluorescente, un radionúclido, o una enzima que cataliza una reacción que resulta en un producto que absorbe o emite luz de una longitud de onda definida) puede usarse para cuantificar los linfocitos T de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que poseen receptores en la superficie celular que son específicos para, y por lo tanto se unirán a, tales complejos. Es probable que un número relativamente alto de tales linfocitos T sea diagnóstico de una enfermedad importante o una indicación de que los linfocitos T están implicados en la inmunidad a la enfermedad. Además, el control continuo de los números relativos de linfocitos T de unión a multímeros puede ser útil para establecer la evolución de una enfermedad o la eficacia de la terapia. Estos ensayos se han desarrollado utilizando tetrámeros de moléculas MHC de clase I que contienen un péptido derivado del VIH-1 o un derivado del virus de la gripe [Altman y col.(1996), Science 274:94 - 96; Ogg y col.(1998), Science 279:2103 - 2106], y cabría esperar que los correspondientes multímeros del MHC de clase II fueran, de forma similar, útiles. Tales complejos podrían producirse mediante la reticulación química de moléculas del MHC de clase II purificadas montadas en presencia de un péptido de interés o mediante modificación de técnicas de recombinación ya establecidas para la producción de moléculas de MHC de clase II que contienen un único péptido definido [Kazono y col.(1994), Nature 369:151 - 154; Gauthier y col.(1998), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:11828 - 11833]. Las moléculas monómeros del MHC de clase II de dichos multímeros pueden ser moléculas nativas compuestas por cadenas α y β de longitud completa. Como alternativa, pueden ser moléculas que contienen o bien los dominios

extracelulares de las cadenas α y β o los dominios de las cadenas α y β que forman las "paredes" y el "suelo" de la hendidura de unión al péptido.

1.1 IMF

Hay dos procedimientos diferentes del IMF, IMF-1 e IMF-2.

5 1.1.1 IMF-1

En el IMF-1, la CPA se pone en contacto con un ligando que tiene una capacidad intrínseca para unirse a un receptor en la superficie de la CPA. Los pares de receptor-ligando candidatos se describen a continuación. Antes de ponerse en contacto con la CPA, el ligando se conjuga con biotina. Cuando el ligando se ha producido mediante tecnología de ADN recombinante, la biotinilación se puede realizar en las células (por ejemplo, bacterias) en las que el ligando se genera por procedimientos tales como los utilizados para biotinilar los antígenos polipeptídicos utilizados en el Ejemplo 1. Como alternativa, el ligando aislado puede biotinilarse *in vitro* mediante procedimientos conocidos en la técnica. El ligando se conjugará con al menos un resto de biotina por molécula. Puede tener 2, 3, 4, 6 o 10 restos de biotina por molécula, siempre que conserve la capacidad para unirse al receptor de superficie celular.

Después de la unión del ligando biotinilado (b-L) a su receptor en la superficie celular, el b-L no unido se elimina mediante lavado y la CPA se pone en contacto con avidina, un polipéptido que se une a la biotina. La avidina puede ser avidina o estreptavidina huevo. También puede ser avidina recombinante que contiene al menos dos dominios de unión a biotina. La avidina nativa contiene 4 dominios de unión a biotina.

Después de la unión de la avidina al resto (s) de biotina en el b-L unido a la superficie de la CPA, la avidina no unida se elimina mediante lavado y la CPA se pone en contacto con un polipéptido de interés (PPI), también conjugado previamente con biotina. La biotinilación del PPI puede realizarse mediante los mismos procedimientos descritos para el ligando y el PPI biotinilado (b-PPI) puede contener el mismo número de restos de biotina por molécula. Sin embargo, con el fin de evitar la posible interferencia con el procesamiento, el PPI contendrá preferentemente 1 resto de biotina por molécula.

Después de la unión del PPI biotinilado (b-PPI) a la avidina en la CPA, el b-PPI no unido se elimina mediante lavado, y se incuba la CPA. Mientras que el procedimiento hasta esta etapa se realiza generalmente en hielo (es decir, a aproximadamente 4 °C), la incubación se lleva a cabo a 37 °C. Como alternativa, la incubación puede realizarse a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) o a una temperatura entre 25 °C y 37 °C. La incubación puede realizarse durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas o 6 horas, dependiendo de lo que da una recuperación óptima de los péptidos. Después de la incubación, las moléculas del MHC de clase II de interés se aíslan mediante uno cualquiera de los diversos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, inmunoprecipitación. Preferentemente, se aísla mediante cromatografía de afinidad utilizando un procedimiento descrito [Gorga y col.(1987), J. Biol. Chem. 262:16087 - 16094].

Los péptidos unidos de forma no covalente a las moléculas del MHC de clase II aisladas se eluyen de ellos. Se puede utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica. Preferentemente, el procedimiento será uno descrito anteriormente [Chicz y col.(1992), Nature 358:764 - 768] y en el Ejemplo 1 en el presente documento.

Los péptidos eluidos se separan mediante uno de una variedad de posibles procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de fase inversa. Todas las fracciones resultantes que contienen péptidos se analizan después individualmente mediante espectrometría de masas con desorción por láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF) usando parámetros que no fragmentan los péptidos. Después, los péptidos correspondientes a todos los "picos" obtenidos en el espectro de MALDI-TOF pueden someterse a análisis de la secuencia aminoácidos individual. Como alternativa, sólo los péptidos correspondientes a los picos que no se observan en un espectro de control generado utilizando una muestra de péptidos obtenidos mediante un procedimiento idéntico pero omitiendo la etapa de poner en contacto la CPA con el b-PPI, pueden someterse a análisis de la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de los péptidos individuales se pueden obtener por medios conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener mediante MALDI-TOF, usando parámetros del instrumento que dan como resultado la fragmentación de los péptidos en pequeños fragmentos que se analizan mediante el espectrómetro de masas. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se comparan después con la del PPI. Aquellos con una secuencia idéntica a una región del PPI son candidatos para VE.

Como alternativa, en lugar de determinar las secuencias de aminoácidos de los péptidos eluidos, los péptidos "estándar" considerados como posibles candidatos pueden someterse a espectrometría de masas MALDI-TOF. Un péptido de ensayo con un pico en la misma posición en el espectro que un péptido estándar probablemente tenga la misma secuencia que el péptido estándar.

1.1.2 IMF-2

El procedimiento IMF-2 es idéntico al procedimiento IMF-1, excepto que, en lugar de poner en contacto la CPA con b-L avidina y luego con b-PPI, el b-L unido a la CPA en IMF-2 se pone en contacto con el PPI conjugado con avidina (av-PPI). Como alternativa, el ligando puede conjugarse químicamente a la avidina para dar un complejo avidina-ligando (L-av). El conjugado av-PPI y L-av se puede fabricar químicamente mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Como alternativa, una proteína de fusión que consiste en el PPI y avidina, o el ligando y avidina, se puede hacer mediante tecnología de ADN recombinante estándar. En cualquier caso, el componente de avidina puede ser avidina de longitud completa o puede ser un fragmento de la molécula de avidina que contiene 1, 2, 3 o los 4 dominios de unión a biotina.

1.2 VE

El procedimiento de VE implica la realización de ensayos de los péptidos identificados mediante IMF para determinar su capacidad de unirse al MHC de clase II del que eluyeron y activar las diversas poblaciones de linfocitos T CD4 +. Se sintetizan péptidos con secuencias de aminoácidos idénticas a las identificadas por IMF o los correspondientes a una secuencia central derivada de un grupo anidado de péptidos identificados mediante IMF. Los péptidos sintéticos se analizan después para determinar su capacidad para unirse al MHC e clase II del que eluyeron y activar los linfocitos T CD4 + de (a) sujetos de ensayo que expresan la molécula de MHC de clase II de interés y que tienen al menos un síntoma de la enfermedad; y (b) sujetos control que expresan la molécula de MHC de clase II de interés y que no tienen síntomas de la enfermedad. Los sujetos de control adicionales pueden ser aquellos con síntomas de la enfermedad y que no expresan la molécula del MHC de clase II de interés. En algunas enfermedades (por ejemplo, aquellas con un componente autoinmune), la capacidad de respuesta en los linfocitos T CD4 + de los sujetos de ensayo, pero no en los linfocitos T CD4 + de los sujetos control descritos en (b,) proporciona pruebas confirmatorias de que el péptido relevante es un epítipo que activa los linfocitos T CD4 + que pueden iniciar, estimular o exacerbar la enfermedad en cuestión. En otras enfermedades (por ejemplo, cáncer o enfermedades infecciosas sin un componente autoinmune), un patrón similar de capacidad de respuesta y de falta de respuesta al descrito en la frase anterior indicaría que el péptido relevante es un epítipo que activa los linfocitos T CD4 + que pueden mediar la inmunidad a la enfermedad o, al menos, producir una disminución en los síntomas de la enfermedad.

La ausencia de una respuesta en los sujetos con síntomas de la enfermedad pero que no expresan la molécula de MHC de clase II proporciona más pruebas de las actividades indicadas de péptido. Por otra parte, una respuesta en tales linfocitos T CD4 + no excluiría necesariamente un papel de este tipo, pero sugeriría que el péptido relevante es capaz de (i) unirse a algunas moléculas del MHC de clase II expresadas por el sujeto pertinente; y (ii) ser reconocido por los linfocitos T CD4 + en asociación con la molécula del MHC de clase II.

Las respuestas de los linfocitos T CD4 + pueden medirse mediante diversos procedimientos *in vitro* conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre entera periférica (PBMC) pueden cultivarse con y sin un péptido sintético candidato y sus respuestas proliferativas se miden mediante, por ejemplo, incorporación de timidina-[³H] timidina en su ADN. Los linfocitos T en proliferación son linfocitos T CD4 + se puede analizar eliminando los linfocitos T CD4 + de las PBMC antes del ensayo o añadiendo anticuerpos inhibidores que se unen a la molécula CD4 + en los linfocitos T, inhibiendo de esta manera la proliferación de estas últimas. En ambos casos, la respuesta proliferativa solo se inhibirá si los linfocitos T CD4 + son las células proliferantes. Como alternativa los linfocitos T CD4 + se pueden purificar a partir de PBMC y analizarse para determinar las respuestas proliferativas a los péptidos en presencia de CPA que expresan la molécula del MHC clase II apropiada. Dichas CPA pueden ser linfocitos B, monocitos, macrófagos o células dendríticas, o PBMC enteras. Las CPA también pueden ser líneas celulares inmortalizadas derivadas de linfocitos B, monocitos, macrófagos o células dendríticas. Las CPA pueden expresar endógenamente la molécula del MHC de clase II de interés o pueden expresar polinucleótidos transfectados que codifican tales moléculas. Cuando los sujetos son seres humanos, las CPA también pueden ser linfocitos T, ya que los linfocitos T humanos son capaces de expresar moléculas del MHC de clase II. En todos los casos, las APC pueden, antes del ensayo, convertirse en no proliferativas mediante tratamiento con, por ejemplo, radiación ionizante o mitomicina-C.

Como una alternativa a la medición de la proliferación celular, la producción de citocinas por los linfocitos T CD4 + se puede medir mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Las citocinas incluyen, sin limitación, interleucina-2 (IL-2), IFN- γ , IL-4, I-5, TNF- α , interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina -10 (IL-10), interleucina-12 (IL- β 12) y el factor transformante de crecimiento (TGF) y los ensayos para medirlos incluyen, sin limitación, ELISA y bio-ensayos en los que las células que responden a la citocina relevante se analizan para determinar la capacidad de respuesta (por ejemplo, proliferación) en presencia de una muestra de ensayo. Como alternativa, la producción de citocinas por los linfocitos CD4 + puede visualizarse directamente mediante tinción de inmunofluorescencia intracelular y citometría de flujo.

Habiendo identificado epítipos peptídicos asociados con una enfermedad en particular, la VE descrito anteriormente puede usarse como prueba de diagnóstico de la enfermedad. Por lo tanto, los linfocitos de un sujeto sospechoso de tener o de ser susceptibles a tener la enfermedad pueden analizarse mediante cualquiera de los procedimientos descritos para una respuesta de linfocitos T CD4 a uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15 o 20) péptidos

apropiados. Si se detecta una respuesta significativa de linfocitos CD4 T, es probable que el sujeto tenga o vaya a desarrollar la enfermedad. La enfermedad puede ser, por ejemplo, DMDI y los péptidos pueden derivar de, por ejemplo, insulina, proinsulina, preproinsulina, GAD65, IA-2, o phogrina. Los péptidos apropiados pueden ser, por ejemplo, cualquiera de los enumerados a continuación (por ejemplo, aquellos con las SEC ID N° 1-42).

- 5 Además, los péptidos que se ha identificado que están asociados con cualquiera de las enfermedades enumeradas en el presente documento (por ejemplo, una enfermedad autoinmune tales como DMDI, EM, o AR) se pueden utilizar para inducir tolerancia inmunológica en los linfocitos (por ejemplo, linfocitos T CD4 +) asociados con el inicio, el progreso, o síntomas patológicos de la enfermedad. La tolerización de estos linfocitos puede ser útil para la profilaxis contra y / o terapia de la enfermedad relevante. La inducción de la tolerancia se puede lograr mediante la
- 10 administración de un péptido apropiado a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene, es sospechoso de tener, o es susceptible a cualquiera de las enfermedades autoinmunes descritas en el presente documento, por ejemplo, DMDI, EM o AR. Los procedimientos de ensayo de la eficacia de un péptido en la inducción de tolerancia, los procedimientos y vías de administración y las dosis a administrar son esencialmente los mismos que los descritos a continuación para APL.
- 15 Como una alternativa a la VE descrita anteriormente, los péptidos identificados mediante IMF pueden analizarse para determinar su capacidad para unirse a una molécula del MHC de clase II apropiada mediante procedimientos conocidos en la técnica usando, por ejemplo, moléculas del MHC de clase II aisladas o células transfectadas con moléculas de ácido nucleico que los codifican. Uno de tales procedimientos se describe en el Ejemplo 2. Estos ensayos de unión también se pueden utilizar para analizar la capacidad de los péptidos para unirse a moléculas del
- 20 MHC de clase II alternativas, es decir, las moléculas del MHC de clase II distintas a las que eluyeron usando el procedimiento de FMI. Los procedimientos de diagnóstico que utilizan dichos péptidos y los procedimientos terapéuticos que usan cualquiera de los péptidos se pueden aplicar a los sujetos que expresan tales moléculas del MHC de clase II alternativas.

1. 3 Enfermedades y sus asociaciones con genes del MHC de clase II

- 25 Los procedimientos se pueden aplicar al análisis de péptidos implicados en enfermedades asociadas con la expresión de moléculas del MHC de clase II definidas y en las que la patología o la protección se debe a la acción de los linfocitos T CD4 + activados. Dichas enfermedades incluyen, sin limitación, ciertas enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades autoinmunes.

- Un ejemplo de una enfermedad infecciosa que cumple los criterios anteriores es la lepra humana, que está
- 30 producida por *Mycobacterium leprae*. Las bacterias infectan y prosperan en las células de Schwann periféricas y en los macrófagos. La enfermedad se caracteriza por una inmunidad celular reprimida pero con respuestas de anticuerpos normales. La lepra se ha asociado con la expresión de moléculas del MHC de clase IIDRB1 en la que el codón 13 codifica Arg o los codones 70 y 71 codifican Arg [Zerva y col.(1996), J. Exp. Med. 183: 829 - 836]. Además, la capacidad para eliminar espontáneamente el virus de la hepatitis C se asocia con la expresión de moléculas de
- 35 DQ B1 * 0301 y, ya que el DQB1 * 0302 está insuficientemente representado en los sujetos infectados por el virus de la hepatitis C, los individuos que expresan DQB1 * 0302 pueden estar protegidos de la infección con el virus [Cramp y col.(1998), J. Hepatol. 29:207 - 213]. Además, los linfocitos T CD4 + específicos de células de melanoma, que pueden estar implicadas en las respuestas inmunes protectoras frente al melanoma maligno, reconocen epítopos de tirosinasa presentados por moléculas HLA-DRB1 * 0401 de clase II [Topalian y col.(1996), citado anteriormente].
- 40 Otras enfermedades asociadas con el MHC de clase II se han enumerado anteriormente.

- Los ejemplos de enfermedades autoinmunes a la que se pueden aplicar los procedimientos de la invención incluyen, sin limitación, la DMDI, artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES) y miastenia gravis (MG). La AR está asociada con la expresión de los alelos DRB1 que codifican el QKRAA motivos (SEC ID N° 53), QRRRAA (SEC ID N° 54) o RRRRAA (SEC ID N° 55) en los restos de aminoácidos 70 - 74
- 45 (DRB1*0101, 0401, 0403, 0405). La EM está asociada con la expresión de los alelos DRB1 * 1501, DQA1 * 0102 y DQB1 * 0602. El LES está asociado con la expresión de los alelos DRB1*03, DRB1*1501, DQA1*0501 y DQB1*0201. La MG está asociada con la expresión de los alelos DR3 y DQ2 (DQA1*0501-DQB1*0201 y DQA1*0201-DQB1*0201). La insuficiencia ovárica autoinmune se asocia con genes DQB1 que codifican Asp en la posición 57. La tiroiditis de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, el hipotiroidismo primario, todos ellos muestran una
- 50 débil asociación con la expresión de los alelos DR5 y DR3. La enfermedad celíaca se asocia con la expresión de los alelos HLA-DQA1 * 0501 y DQB1 * 0201. La cirrosis biliar primaria se asocia con la expresión de los alelos DRB1*0801-DQA1 - 0401/0601-DQB1*04. La hepatitis autoinmune se asocia con la expresión de los alelos DRB3 * 0101 o DRB1 * 0401. La enfermedad de Addison se asocia con la expresión de los alelos DRB1*03, DQA1*0501 y DQB1*0201. El vitíligo se asocia con la expresión de los alelos DRB1*0701 y DQ2. La enfermedad anti-membrana
- 55 basal glomerular (síndrome de Goodpasture) se asocia con la expresión de los alelos DR15 y DR4.

La patología en la AR, EM, y la DMDI se considera que se debe predominantemente a respuestas autoinmunes dependientes de linfocitos T CD4+ mediada por células, mientras que la del LES y la MG se debe predominantemente a respuestas autoinmunes mediadas por anticuerpos dependientes de los linfocitos T CD4+. En

la AR, la respuesta inflamatoria inducida por los linfocitos T CD4 + activados se centra en la sinovia de las articulaciones, en la EM en las vainas de mielina de los nervios y en DMDI en las células β pancreáticas ubicadas en los islotes de Langerhans. El LES es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta a múltiples órganos. La fatiga muscular observada en la MG se debe al desarrollo en el paciente de anticuerpos que se unen al receptor de la acetilcolina en las uniones neuromusculares.

1.3.1 DMDI

La diabetes es un síndrome en el que los niveles de glucosa en sangre son anormalmente altos. Los niveles de glucosa en sangre se controlan normalmente con la liberación de la hormona insulina de las células β situadas en los islotes de Langerhans en el páncreas. La diabetes de tipo 1 (DMDI), la clase de la diabetes relevante para la presente solicitud, es el resultado de la destrucción de las células β . El nivel de glucosa en sangre resultante, si no se controla, produce deshidratación, alteraciones del equilibrio ácido / base en la sangre, inflamación cerebral, coma y muerte. El tratamiento con inyecciones de insulina humana sintética restaura el control de la glucosa. Una vez iniciado, sin embargo, se requiere este tratamiento de por vida ya que las células β no se regeneran. Una vez establecida, la diabetes es una carga importante para el paciente, para la familia del paciente, y para la sociedad. Aunque las modernas dosis y preparaciones de insulina pueden mantener la glucosa en la sangre dentro de límites razonables, a lo largo de varios años las complicaciones de la enfermedad son inevitables. Las complicaciones más graves de la diabetes son insuficiencia renal, ceguera y pérdida de la función nerviosa. En los países desarrollados, la diabetes es la causa principal de insuficiencia renal crónica que requiere diálisis a largo plazo o trasplante. La duración de la vida de un paciente diabético se reduce en un promedio de 10 años. Ser una enfermedad relativamente frecuente (la DMDI afecta a 1/200 - 1/400 de la población), consume una gran cantidad de recursos; se estima que en el mundo desarrollado los costes del cuidado de la diabetes son del 8 % del presupuesto de los servicios de salud de agudos.

A la luz de estos antecedentes, es importante considerar si hay formas en las que se pueda impedir el desarrollo de DMDI. En primer lugar, la destrucción de células β tiene lugar durante muchos meses o años hasta que hay demasiadas pocas células sintetizando insulina (aproximadamente 10 % de lo normal) para mantener la normoglucemia y se diagnostica al paciente diabetes. Si el proceso de daño celular β pudiera detenerse, la DMDI no se desarrollaría. En segundo lugar, ahora es posible predecir quién desarrollará DMDI en el futuro con un alto grado de sensibilidad (es decir, una buena tasa de "pick-up") y especificidad (una tasa de falsos positivos baja) a través de simples análisis de sangre. En tercer lugar, parece que las células β se destruyen como parte de una respuesta inmune inadvertida, durante la cual los componentes normales de la célula (proteínas denominadas autoantígenos) se convierten en el objetivo de un ataque autoinmune. Varios de los principales autoantígenos de las células β se han identificado (véase más adelante). Otra característica clave de la DMDI es la fuerte influencia genética en el desarrollo de la enfermedad. Aunque varios genes están involucrados, los más predominantes son los genes de clase II del MHC humano, es decir, los genes del antígeno leucocitario humano (HLA). Estos genes ejercen un control dominante sobre la respuesta inmune, mediante la selección de los segmentos peptídicos (epítomos) dentro de autoantígenos contra los que el sistema inmune de un individuo en particular centra su ataque. Al identificar estos epítomos, será posible elaborar estrategias para intervenir en el desarrollo de la enfermedad en una fase pre-clínica.

El complejo de genes del HLA es el más polimórfico en el genoma humano, por lo que la posibilidad de que un individuo exprese diferentes moléculas de HLA es alta. Sin embargo, en pacientes con DMDI, un conjunto muy limitado de genes de HLA de clase II está fuertemente asociado con el desarrollo de la enfermedad. Como resultado, dentro de una población racialmente definida, los genes HLA de clase II concretos son mucho más comunes en los diabéticos en comparación con la población total. A continuación se presentan ejemplos de los genes de HLA de clase II que se encuentran con mayor frecuencia en pacientes de DMDI de América del Norte y del Norte de Europa y, por tanto, probablemente tengan un fuerte papel de contribución al desarrollo de la enfermedad.

Tipos de HLA-DR de clase II: DRB1*0401, 0405

Tipos de HLA-DQ de clase II: DQB1*0302, 0201, 0501; DQA1*0501, 0301.

A continuación se indican genotipos de susceptibilidad en caucásicos, negros, y japoneses.

Caucásicos:

DRB1*04, DQA1*0301, DQB1*0302
DRB1*04, DQA1*0301, DQB1*0201
DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201

Genotipos de susceptibilidad adicionales en negros

DRB1*09, DRB1*07, DQA1*0301, DQB1*0201

Genotipos de susceptibilidad adicionales en japoneses:

DRB1*08, DQA1*0301, DQB1*0302
DRB1*09, DQA1*0301, DQB1*0303

Una cuestión crucial es: ¿cómo difieren las moléculas de HLA de clase II en la función entre un diabético que posee HLA-DQA1 * 0301 / DQB1 * 0302 (DQ8) y un no diabético que posee HLA-DQA1 * 0102 / DQB1 * 0602 (DQ6), que parecen ser protectoras frente a la DMDI? Se sabe que las diferentes moléculas de HLA de clase II seleccionan y presentan diferentes epítopos peptídicos para los receptores de linfocitos T. Por lo tanto, es probable que una molécula de HLA de clase II “estimulante de la diabetes” seleccione un epítipo peptídico de alguna manera que inicia o favorece una respuesta autoinmune peligrosa.

En pacientes de DMDI de América del Norte y del Norte Europea, HLA-DRB1 * 0401 está moderadamente asociado con la DMDI, mientras que el tipo DRB1 * 0405 tiene una mayor influencia sobre el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, un grupo particular de moléculas de HLA-DQ contribuyen a la susceptibilidad más fuerte. En este grupo se encuentran las moléculas de HLA-DQ que contienen una cadena polipeptídica α con el aminoácido arginina en la posición 52 (arg52 α), y una cadena polipeptídica β con cualquier aminoácido distinto de aspartato en la posición 57 (no asp57 β). Uno de los mejores caracterizados de estos es HLA-DQ8 (véase anteriormente), que típicamente está unido a HLA DRB1 * 0401 (es decir, los dos genes se encuentran a menudo juntos en el mismo cromosoma). Estos genes confieren el mayor riesgo de DMDI [Khalil y col.(1992), Diabetes 41:378 - 384]. Se estima que un individuo que expresa una molécula HLA-DQ arg52 α / no asp57 β que tiene un familiar de primer grado con DMDI tiene una probabilidad de 1: 4 de desarrollar la propia DMDI; es decir 100 veces el riesgo de la población [Nepom, G.T. (1995), Annu. Rev. Med. 46:17 - 25].

1.4 Especies

Los procedimientos se pueden aplicar a las enfermedades con las características descritas en una amplia gama de especies de mamíferos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos, cobayas, hámsteres, ratas y ratones. Preferentemente se aplicarán a enfermedades de seres humanos.

Es conocido, por ejemplo, que ciertas cepas de ratones son susceptibles a formas murinas de AR, EM, DMDI y LES. Por otra parte, en estos ratones, la susceptibilidad está asociada con la expresión de genes del MHC de clase II concretos y el daño del tejido se debe a la acción de los linfocitos T CD4 + activados o a respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T CD4 +. Por ejemplo, el ratón diabético no obeso (NOD), que es susceptible a DMDI espontánea, expresa la molécula H-2A^g y la susceptibilidad de los ratones NOD a DMDI se ha relacionado con el gen H-2A^{g7}. Además, la destrucción de tejidos en la DMDI en NOD se ha demostrado que está mediada por los linfocitos T CD4 +. Además, la susceptibilidad a la artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones se ha asociado con la expresión de las moléculas del MHC de clase II H-2A^{un}, H-2A^r, H-2A^{w3} y H-2A^{w17} y la patología articular en la AIC se considera generalmente que está mediada por linfocitos T CD4+.

Con respecto a los tipos de cáncer, los sarcomas de células reticulares de ratones SJL son dependientes para el crecimiento de las citocinas producidas por los linfocitos T CD4 + activados y requieren la expresión de ciertas moléculas del MHC de clase II.

1.5 Moléculas del MHC de clase II

Las moléculas de MHC de clase II han sido identificadas en múltiples especies de mamíferos. En algunas de estas especies, la expresión de una molécula de MHC de clase II en particular se ha asociado con una enfermedad mediada por linfocitos T CD4 + determinadas (véase anteriormente). En los seres humanos, por ejemplo, las moléculas del MHC de clase II se denominan HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP y en ratones, H-2A y H-2E. En todas las especies, existen múltiples alelos de cada gen.

1.6 Células presentadoras de antígeno (CPA)

Las CPA que puede usarse para los procedimientos IMF serán las enumeradas anteriormente para uso en la VE, es decir, linfocitos B, macrófagos, monocitos, células dendríticas, y, en seres humanos, linfocitos T. Como alternativa, se pueden utilizar líneas inmortalizadas de tales células.

Los ligandos que podrían usarse con las CPA linfocitos B incluyen lectinas tales como el mitógeno de hierba carmín (PWM); anticuerpos (o fragmentos funcionales de anticuerpos tales como fragmentos Fab, F (ab')₂ o Fv) que se unen a receptores de la superficie de las CPA que son componentes de la maquinaria celular para la internalización y presentación del antígeno, o están involucrados en la señalización para la internalización de antígenos, por ejemplo, los receptores del complemento (CD21, CD35, CD11b / CD18, CD11c / CD18), el complejo receptor de células B (incluyendo moléculas de inmunoglobulina), receptores de manosa, CD19, CD22, CD40, CD20, y CD45; ligandos para los receptores mencionados anteriormente en las células B (por ejemplo, ligando CD40 soluble) y otras CPA; y moléculas de Ig de especificidad irrelevante o con la capacidad de unirse al PPI o un marcador (por ejemplo, un péptido o hapteno) conjugado al PPI o fragmentos de tales moléculas que incluyen la porción Fc y, por

lo tanto, se pueden unir a los receptores Fc en membranas de las células CPA.

Los receptores a los que se unen los ligandos anteriores son como sigue: PWM, que deriva de *Phytolacca americana*, se une a un número de restos de hidratos de carbono. Se une selectivamente los miembros unidos por disulfuro de la familia Ig de proteínas, por ejemplo, las moléculas de Ig de superficie que constituyen los receptores específicos de antígeno de los linfocitos B. Cualquier molécula en la superficie de las células B a las que puede unirse PWM será un receptor para PWM. Las lectinas que se podrían utilizar en lugar de PWM incluyen las siguientes moléculas de unión a hidratos de carbono: lectina de guisante, concanavalina A, lectina de lenteja, fitohemaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris*, aglutinina de cacahuete, aglutinina de soja, aglutinina de *Ulex europaeus*-I, aglutinina de *Dolichos biflorus*, aglutinina de *Vicia villosa* y aglutinina de *Sophora japonica*. Los receptores de anticuerpos o ligandos que se unen a los receptores de la superficie de las CPA, por definición, son los receptores mismos, ejemplos de los cuales se enumeran anteriormente. Los receptores para las moléculas de Ig de especificidad irrelevante o con la capacidad de unirse al PPI o un marcador conjugado con el PPI, o fragmentos de tales moléculas que incluyen porciones Fc, son los receptores Fc sobre linfocitos B, macrófagos y monocitos.

1.7 Antígenos polipeptídicos

Los antígenos polipeptídicos que pueden usarse con los procedimientos de IMF pueden ser aquellos con una secuencia de aminoácidos conocida o aquellos en los que al menos parte de la secuencia de aminoácidos se conoce. Pueden ser polipéptidos que se sabe o que son sospechosos de estar involucrados en el proceso de la enfermedad (por ejemplo, IA-2 en la DMDI) o pueden derivar de organismos microbianos que se sabe o se sospecha que están involucrados en el proceso de la enfermedad (por ejemplo, *M. leprae* en la lepra). Ejemplos de otros antígenos polipeptídicos incluyen las proteínas del núcleo y de la cubierta viral de virus tales como el virus de la hepatitis C, las proteínas del choque térmico de micobacterias, y la tirosinasa en el melanoma. Por otra parte, el antígeno polipeptídico puede ser la proteína de longitud completa o puede ser un fragmento de la proteína que se sabe o se sospecha que está involucrada en el proceso de la enfermedad (por ejemplo, la porción intracelular de IA-2 en la DMDI).

Ejemplos de polipéptidos que se sospecha que son autoantígenos en la EM (incluyendo la encefalomiелitis autoinmune experimental murina) son la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolipídica (PLP), la proteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), y alfa B-cristalina. El colágeno se considera que es un autoantígeno en la AR, el receptor de acetilcolina en la MG, y la proteína Smith, RNP ribonucleoproteína, y las proteínas SS-A y SS-B en el LES. Otra enfermedad autoinmune y los polipéptidos que se han implicado como autoantígenos en su génesis se enumeran a continuación:

Insuficiencia ovárica autoinmune: 3p hidroxisteroide deshidrogenasa

Tiroiditis de Graves: tiroglobulina, peroxidasa tiroidea y receptor de la hormona estimulante del tiroides

Tiroiditis de Hashimoto: tiroglobulina y peroxidasa tiroidea

Hipotiroidismo primario: tiroglobulina y peroxidasa tiroidea

Enfermedad celíaca: transglutaminasa

Cirrosis biliar primaria: piruvato deshidrogenasa Hepatitis autoinmune: citocromo P4502D6

Enfermedad de Addison: 21- α -hidroxilasa

Vitiligo: tirosinasa

Enfermedad anti-membrana basal glomerular (síndrome de Goodpasture): colágeno tipo IV

Esclerosis sistémica: Scl-70

Una descripción más detallada de los autoantígenos sospechosos de estar involucrados en la DMDI se proporciona a continuación.

La respuesta autoinmune inapropiada que conduce a la DMDI se dirige a las proteínas en la célula β pancreática. Hay varios autoantígenos que se han asociado con la DMDI, de los cuales 3 se consideran los más importantes: la insulina / proinsulina; ácido glutámico descarboxilasa (isoforma de 65 kDa; GAD-65); e IA-2. El término "mayor" en el presente documento se usa para denotar el hecho de que: a) la mayoría (es decir, 80-90 %) de los pacientes con DMDI producen una respuesta inmune a al menos uno de estos 3; y (b) en la predicción de la DMDI en individuos de alto riesgo, una respuesta inmune a los 3 autoantígenos comporta un riesgo muy fuerte de futura DMDI.

La insulina se sintetiza inicialmente como pre-proinsulina (106 aminoácidos), y la molécula resultante de la escisión de la secuencia líder se denomina proinsulina. La proinsulina (82 aminoácidos) es un polipéptido sencillo en bucle

sobre sí mismo mediante 2 puentes disulfuro intracatenarios. La cadena C (también denominado péptido C, 31 aminoácidos) de la proinsulina se escinde para dar la forma secretada de la insulina que comprende dos cadenas (A, 30 aminoácidos de longitud, y B, 21 aminoácidos de longitud) unidos por los 2 puentes disulfuro.

Los anticuerpos que surgen espontáneamente contra la insulina (autoanticuerpos de la insulina, IAA) se identificaron por primera vez en pacientes diabéticos recién diagnosticados no tratados en 1983 [Palmer y col.(1983), Science 222:1337 - 1339]. Por lo general, el 40-50 % de los pacientes jóvenes con DMDI o pre-DMDI tiene IAA, mientras que son menos frecuentes en los adolescentes y adultos. Se ha demostrado que los autoanticuerpos contra la insulina reaccionan igualmente bien con la insulina humana, porcina, bovina, de rata, de oveja y de pollo, pero no reaccionan con cadenas aisladas A o B de la insulina [Castano, L. y Eisenbarth, G.S. (1990), Annu. Rev. Immunol. 8:647 - 79], lo que sugiere que ambas cadenas contribuyen a formar el o los epítipo (s) de estos autoanticuerpos. Trabajos recientes han proporcionado más pruebas de la participación de ambas cadenas A y B en la generación de epítipo, lo que sugiere que una secuencia de 6 aminoácidos en la cadena A y una secuencia de 3 aminoácidos en la cadena B se incluyen en los epítopos reconocidos por los autoanticuerpos de insulina; esta región difiere del dominio de unión al receptor de insulina [Castano y col.(1993), Diabetes 42:1202 - 1209]. Los autoanticuerpos frente a la proinsulina pueden detectarse en el 22 % de los pacientes prediabéticos antes de la aparición de la diabetes tipo 1 [Kuglin y col.(1990), Diabet. Med. 7:310 - 314].

Baekkeskov y col. demostraron que más del 80 % de los niños diabéticos recién diagnosticados tenía autoanticuerpos frente a un autoantígeno de células β de 64 kDa de masa molecular relativa [Baekkeskov y col.(1982), Nature 298:167 - 169], y los autoanticuerpos también estaban presentes en parientes en alto riesgo de futura aparición de diabetes [Baekkeskov y col.(1987), J. Clin. Invest. 79:926 - 934; Atkinson y col.(1990), Lancet 335:1357 - 60]. La identificación molecular del antígeno de 64 kDa como GAD se hizo en 1990 [Baekkeskov y col.(1990), Nature 347:151 - 156]. GAD es una enzima implicada en la síntesis del neurotransmisor inhibidor del ácido γ -aminobutírico y probablemente tiene un papel en la señalización para la liberación de insulina. Hay dos isoformas de la enzima: GAD65 y GAD67. Con mucho, el principal representante en los islotes de Langerhans humanos es GAD65. Los autoanticuerpos contra GAD65 están presentes en el suero del 70-80 % de los pacientes con DMDI de nuevo inicio [Petersen y col.(1994), Diabetes 43:459 - 467]. Como IAA, los autoanticuerpos de GAD son un marcador predictivo temprano de la enfermedad, asociado con un alto riesgo para el desarrollo de la DMDI. Están presentes en más del 80 % de los individuos que se sabe que están en alto riesgo de desarrollar DMDI, debido a antecedentes familiares y la presencia de marcadores de inmunidad [De Aizpurua y col.(1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9841 - 9845; Seissler y col.(1993), J. Clin. Invest. 92:1394 - 1399].

En los primeros experimentos de inmunoprecipitación, el tratamiento suave con tripsina de una proteína de 64 kDa de células de los islotes tuvo como resultad la formación de fragmentos de proteínas de 40 kDa y 37 kDa que se unen a los autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con DMDI [IDDM [Christie y col.(1990), J. Exp. Med. 172:789 - 794]. Más importante aún, se demostró que los anticuerpos contra estos fragmentos son altamente predictivos de la DMDI en individuos en riesgo [Christie y col.(1994), Diabetes 43:1254 - 1259]. Ahora se han identificado las dianas moleculares de estos autoanticuerpos. El fragmento de 40 kDa es un componente de IA-2, también llamado de forma confusa ICA512 [Payton y col.(1995), J. Clin. Invest. 96:1506 - 1511; Bonifacio y col.(1995), J. Immunol. 155:5419 - 5426; y Rabin y col.(1994), J. Immunol. 152:3183 - 3188]. Posteriormente, el fragmento de 37 kDa se identificó como phogrina (IA-2 β), una tirosina fosfatasa que comparte un 85 % de homología con IA-2. Los autoanticuerpos contra IA-2 y phogrina aparecen durante el periodo prediabético [Bonifacio et al (1998), J. Immunol. 161:2648 - 2654] y son altamente predictivos de desarrollo de DMDI en individuos en riesgo. IA-2 se sintetiza como una proteína grande de 106 kDa que tiene un dominio intracelular en los restos 603 a 1.055. El dominio intracelular de IA-2 es el objetivo de casi toda la reactividad de los autoanticuerpos frente a IA-2 [Kawasaki y col.(1997), J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:375 - 80].

2. Péptidos

Los péptidos de la invención derivan de IA-2 y pueden unirse a moléculas de HLA-DR4. Los péptidos pueden ser, por ejemplo, uno cualquiera de los siguientes péptidos: YLKNVQTQETRRL (SEQ ID NO:10); YLKNVQTQETRRLTQ (SEC ID N° 13); FYLKNVQTQETRRLTQFHF (SEC ID N° 16); AYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 17); LAKEWQALCAYQAEPNT (SEC ID N° 19); AYQAEPNTCATAQGEGNIK (SEC ID N° 20); WQALCAYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 21); LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (SEC ID N° 22); y KLKVESSPSRSDYINAS (SEC ID N° 40)

Los péptidos se pueden preparar usando las metodologías IMF descritas. Los péptidos más pequeños (DE menos de 50 aminoácidos de longitud) también pueden sintetizarse convenientemente por medios químicos estándar. Además, tanto los polipéptidos como los péptidos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación / recombinación genética *in vivo* utilizando las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos o péptidos apropiados. Se pueden usar procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias de codificación relevantes y las señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989], y Ausubel et

al., Current Protocols in Molecular Biology, [Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989].

Para expresar los péptidos y polipéptidos se pueden usar varios sistemas de vector de expresión-huésped. Dichos sistemas huésped-expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir los polipéptidos de interés y, posteriormente, se pueden purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias nucleotídicas codificadoras adecuadas, producir el péptido o polipéptido relevante *in situ*. Estos incluyen, entre otros, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión ADN de bacteriófago recombinante, de ADN plasmídico o de ADN de cósmido, que contienen secuencias de codificación del péptido TR₁ - 41; levaduras, por ejemplo *Saccharomyces* o *Pichia*, transformadas con vectores de expresión recombinante de levaduras que contienen las secuencias de codificación adecuadas; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus, por ejemplo baculovirus; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión en virus recombinantes, por ejemplo el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformadas con vectores de expresión en plásmidos recombinante, por ejemplo, el plásmido Ti, que contienen las secuencias de codificación adecuadas; o sistemas de células de mamífero, por ejemplo células COS, CHO, BHK, 293 o 3T3 que alojan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero, por ejemplo el promotor de metalotioneína, o de virus de mamíferos, por ejemplo el promotor tardío de adenovirus o el promotor 7,5 K del virus vaccinia.

Los siguientes ejemplos se pretende que sean ilustrativos, no limitantes, de la invención.

Ejemplos

20 Materiales y procedimientos

Generación de líneas de células B transformadas con el virus de Epstein-Barr (EBV) Las líneas de linfocitos B transformadas con EBV se propagaron en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, penicilina / estreptomycin y 10 % de suero bovino fetal (FCS) en 50-100 matraces de 175 cm² para lograr altos volúmenes de células. Las células transformadas con EBV utilizadas fueron células de Priess que son homocigotas para el genotipo de HLA DRB1*0401, DRB4*0101 [DR4/DRw53], DQA1*0301/DQB1*0302[DQ8] permisivo para DMDI.

Aproximadamente el 50 % de las células se recolectaron cada 2-3 días mediante granulación, se lavaron con solución de sales equilibrada de Hanks (HBSS), se contaron, se resuspendieron en HBSS, y se utilizaron para el procedimiento IMF.

Antígenos polipeptídicos biotinilados. Los antígenos recombinantes se generaron en *E. coli*. La porción intracelular de IA-2 (IA-2iC) se generó utilizando el vector Pinpoint (Promega, Madison, WI) que produce proteínas de fusión acopladas en el extremo N a una secuencia líder biotinilada en un solo resto de lisina. Esto permitió la purificación utilizando columnas de avidina monoméricas y también produjo una forma biotinilada del antígeno de interés para uso en el sistema de liberación de antígenos (SLA) (véase más adelante). El vector Pinpoint contiene ADNc que codifica IA-2iC fue proporcionado amablemente por el Dr. M. Christie, King's College London [Payton y col.(1995), J. Clin. Invest. 96:1506 - 1511]. Las condiciones para la purificación de IA-2iC fueron como se ha establecido anteriormente [Payton y col.(1995), citado anteriormente]. En resumen, las células de la cepa de *E. coli* JM109 se transformaron con el vector Pinpoint que contiene el ADNc de IA-2iC.

Las colonias se subcultivaron en placas de medio mínimo/ agarosa y las colonias individuales se eligieron y se cultivaron durante la noche a 37 °C con agitación en medio mínimo que contiene d-biotina 2 µM y 100 µg/ml de ampicilina. Una vez que el cultivo había alcanzado una A₆₀₀ de 0,5, se transfirió (dilución 1:10) en medio LB que contenía d-biotina 2 µM y se cultivaron a 37 °C con agitación durante una hora. La expresión de proteínas se indujo en la fase logarítmica de crecimiento utilizando isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 100 µM.

Las células se recolectaron después de 3-5 horas de agitación a 37 °C, mediante centrifugación a 8,000 g a 4 °C. El sedimento celular se resuspendió en tampón de precipitado celular (CPB; tampón fosfato 100 mM, pH 7,2 que contiene benzamidina 10 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM).

A continuación, las células se lisaron en hielo y las proteínas solubles se liberaron usando una combinación de tratamiento con lisozima (1 mg / ml), Triton X-100 (0,1%) y desoxirribonucleasa (200 U/ml). Después de la eliminación de los restos celulares por centrifugación (14. 000 g durante 15 minutos a 4 °C), la proteína de fusión biotinilada se purificó a partir del sobrenadante mediante el paso, a un caudal de 8 ml / hora, a través de una columna de avidina-resina (SoftLink, Promega, Madison, WI) preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y equilibrada en CPB. Después de un lavado extenso de la columna, la proteína de fusión biotinilada se eluyó usando un exceso de d-biotina 5 µM, se separó de la d-biotina libre usando una columna G-25 (Pharmacia), y se concentró de 10 a 100 veces utilizando un concentrador Amicon B15 con un "corte" de peso molecular de 15 kDa. La pureza, que era típicamente > 90 %, se evaluó mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western en el que se utilizó avidina-peroxidasa en la etapa de desarrollo.

El ADNc de GAD65 obtenido del ARN extraído de los islotes pancreáticos humanos se clonó en el vector pET 12 (Stratagene), en el que la expresión está controlada mediante el promotor de T7 aguas abajo de una secuencia de marcadora de biotilación y un marcaje de purificación de histidina diseñado basado en el vector Pinpoint. Este sistema del vector pET 12 tiene la ventaja de que la expresión de proteínas de fusión puede inducirse en la cepa deficiente de proteasa de *E. coli*, BLR (DE3) pLysS.

GAD65 se generó del siguiente modo. Las bacterias BLR (DE3) pLysS se transformaron con el vector que contiene el ADNc de GAD65 y se eligió una colonia en LB y se cultivó a 37 °C con agitación a 225 rpm hasta alcanzar una A_{600} de 0.6-1.0. Las células se resuspendieron después en LB fresco, se sembraron a una dilución de 1:25, se cultivaron en las mismas condiciones a una A_{600} 0.4, y se indujeron con IPTG 2 mM durante 3 horas. Un sedimento bacteriano obtenido mediante centrifugación se resuspendió en hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 8 M, NaH_2PO_4 50 mM, Tris 10 mM, 0.1 % Triton X-100, 2-mercaptoetanol (2-ME) 50 mM, pH 8.0; se sonicó; y se centrifugó durante 1 hora a 4 °C a 40.000 g. El sobrenadante se dializa frente a un exceso de 10 veces del tampón GuHCl 8M sin 2-ME y después se añadió a una suspensión de resina de níquel al 50 % durante 1 hora, agitando a temperatura ambiente. La resina de níquel se resuspendió en una columna y se lavó con tampones de urea proporcionadas por los fabricantes de la resina de níquel (Qiagen, Alemania), pero suplementado con 2-ME 5 mM y 0.1 % de Triton X-100. Las proteínas se eluyeron utilizando tampones de urea de pH 5.9 y pH 4.5 y se dializaron contra urea 4 M, que contiene fosfato de piridoxal 50 mM, glutamato sódico 20 mM, 0.05 % de Triton X-100, 2-ME 5 mM y L-arginina 2M. La preparación se dializó después contra el tampón de carrera en el gel dodecilsulfato sódico (SDS) (0.1 %) que contiene glutatión 2.5 mM, fosfato de piridoxal 50 mM. La diálisis se repite frente a un tampón idéntico que contiene una concentración 10 veces inferior de SDS. A continuación, diálisis se realizó frente a una solución que contiene HEPES 4 mM, glutamato sódico 20 mM, fosfato de piridoxal 50 mM, glutatión 2.5 mM. La diálisis final fue contra el mismo tampón sin glutamato sódico. En esta etapa, la GAD65 biotinilada amarilla se almacenó a 4 °C o liofilizada.

El ADNc humano de pre-proinsulina fue proporcionado amablemente por el Dr. D. Steiner y se ha clonado como se ha descrito anteriormente para GAD65. Se produjo pre-proinsulina biotinilada y se purificó en condiciones similares a las de la producción y purificación de GAD65.

Sistema de liberación de antígeno (SLA). Para los SLA, células de Priess recolectadas y lavadas se suspendieron a 5×10^7 / ml en HBSS frío suplementado con b-PMW (300 ng / ml) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después de lavar en HBSS, las células se resuspendieron a 5×10^7 / ml en HBSS que contienen 0.5 mg / ml de avidina y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después del lavado, las células se resuspendieron en HBSS suplementado con 10-40 mg / ml de IA-2ic biotinilado y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después del lavado, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640/10% FCS (1×10^6 / ml) precalentado y se cultivaron a 37 °C en 5% de CO_2 durante 6 horas. Las células se sedimentaron y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizó la purificación molécula de HLA.

Purificación de HLA de clase II. La purificación de la molécula DR4 se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente [Gorga y col.(1987), J. Biol. Chem. 262:16087 - 16094]. Los sedimentos celulares que se habían obtenido a partir de los SLA y almacenados a -80 °C se descongelaron y se homogeneizaron en tampón hipotónico. Una fracción de membrana en bruto se preparó mediante centrifugación de alta velocidad y se solubilizó en NP40. La fracción de detergente soluble se pasó por una serie de columnas de inmunoafinidad que contienen el material de matriz de la Proteína-A Sepharose o AffiGel 10 conjugado con anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen a moléculas de MHC de clase I (mAb W6 / 32), moléculas de DR (mAb LB3.1 o mAb L243), y moléculas de la familia de DQ3 (mAb IVD12), respectivamente. Cada uno de estos mAb reconoce la conformación nativa en dímero de las moléculas de HLA de clase I o de clase II en las células de las líneas de linfocitos B que se indican. Las columnas de inmunoafinidad se eluyeron con glicina 50 mM, pH 11.5 / 0.1% de desoxicolato sódico, e inmediatamente se neutralizaron y se dializaron contra Tris 10 mM, pH 8.0 / 0.1% de desoxicolato sódico. La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE y se cuantificó mediante el ensayo de BCA.

Análisis de péptidos. Todas las muestras de la proteína HLA de clase II se concentraron hasta 100 µl usando un dispositivo de ultrafiltración (Amicon Centricon 10) antes de la extracción del péptido. Los repertorios de péptidos procesados de forma natural se eluyeron con ácido de las moléculas de HLA de clase II mediante la adición de 800 µl de ácido acético al 10 %, y se incubaron durante 15 minutos a 70 °C, como se describe [Chicz y col.(1993), J. Exp. Med. 178:24 - 47]. Los péptidos se separaron de la proteína HLA restante por ultrafiltración con el dispositivo Centricon 10. La fracción de "flujo continuo", que contiene los péptidos extraídos con ácido se concentró en un Savant SpeedVac a un volumen de aproximadamente 20-30 µl se almacenó a -80 °C. Las mezclas de péptidos extraídas con ácido se separaron mediante cromatografía en fase inversa como se ha descrito anteriormente [Chicz y col. (1993), citado anteriormente], pero con modificaciones menores. Brevemente, las separaciones se llevaron a cabo usando una columna C18 microbore (1.0 x 250 mm; Vydac, Hesperia, CA) con un caudal de 50 µl / minuto. El efluente de la columna se dividió de forma que el 2 % se cargó inmediatamente sobre una placa para muestras de espectrometría de masas con desorción láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF), recogiendo el 98% restante para su almacenamiento a -20 °C. Las muestras se prepararon para el análisis de espectrometría de masas mediante la adición de 0.4 µl de la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxinámico, 10 mg / ml en 50 % de acrilonitrilo/0.1 % de ácido trifluoroacético) y se dejaron secar al aire. Los espectros de masas se recogieron a

intensidades de láser óptimas promediando las señales de iones de 128 exploraciones individuales en los modos lineales y de reflector usando un espectrómetro de masas reflector longitud de una sola etapa extendido de tiempo de vuelo (Voyager Elite XL; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). El tiempo de conversión en masa se realizó mediante calibración externa utilizando péptidos sintéticos.

- 5 Se desarrolló una espectrometría de masas-cromatografía líquida de microcapilaridad automática (CL-EM) con datos dependientes de disociación asistida por colisión (CAD) para la secuenciación de los niveles bajos de los péptidos asociados con HLA procesados de forma natural para secuenciar directamente masas de péptidos diana como se determina mediante el abordaje MALDI-TOF-MS previamente descrito. Las fracciones de péptidos separadas mediante cromatografía de fase inversa se diluyen hasta un volumen final de 5-20 μ l para ayudar a la manipulación y permitir el uso de separaciones de fase inversa de segunda dimensión. La solución peptídica resultante puede preconcentrarse después atrapando péptidos usando un lecho pequeño (0,5 a 1,0 μ l) de soporte polimérico de fase inversa. Esto también facilita la eliminación de los contaminantes hidrófilos mediante lavado de la trampa con una solución acuosa. Posteriormente, los péptidos se lavan de nuevo desde la fase de captura sobre la microcapilaridad (con un diámetro interior de 75 μ m y se empaquetan con 5-15 cm de 1-7 μ m a 100-200 Å C_{18} o material no poroso) y la separación se desarrolla utilizando un gradiente no lineal. Un caudal de la fase móvil de -0,5 μ l/min se consigue dividiendo el flujo de las bombas y usando una columna de equilibrado. La detección peptídica se realiza mediante EM dp-electropulverización. El voltaje necesario para dirigir la electropulverización se aplica a la cabeza de la columna de microcapilaridad y los péptidos son electropulverizados en el analizador de masas directamente a medida que eluyen del capilar. Los experimentos de CAD se activan de un modo dependiente de los datos, usando iones que son más abundantes que un umbral establecido. Se usa exclusión dinámica para asegurar la máxima cobertura del péptido (es decir, las respuestas menores se analizan mediante CAD tras un número determinado de usuario de experimentos de CAD de una sola respuesta de péptido) escribiendo una lista de exclusión durante la progresión del ensayo de modo que un ión dado no será analizada mediante múltiples experimentos CAD. El tiempo que un ión dado reside en la lista de exclusión depende de la calidad de las separaciones cromatográficas. Esto se debe determinar experimentalmente. De esta manera, se pueden analizar las respuestas isobáricas separadas. Con este método se puede conseguir una sensibilidad de la secuenciación de péptidos mejor que 1 fmol.

Verificación de epítomos (VE)

- Para establecer que los epítomos peptídicos identificados son relevantes para la DMDI (es decir, que son reconocidos por los linfocitos T CD4 + de pacientes con DMDI o pre-DMDI que expresan la molécula de DR4, pero no por los controles no diabéticos que también expresan la molécula DR4), se llevaron a cabo ensayos de proliferación de linfocitos T utilizando péptidos sintéticos que tienen secuencias de aminoácidos sobre la base de los péptidos identificados mediante espectrometría de masas que se derivan de IA-2iC. Los péptidos se sintetizaron utilizando química de Fmoc con un sintetizador de péptidos Applied Biosystems SYNERGY y se purificaron mediante RP-HPLC preparativa en un sistema Waters Alliance 2690 equipado con un módulo de compresión radial. Las secuencias de aminoácidos y la pureza superior al 90 % para todos los péptidos sintéticos se confirmaron mediante MALDI-MS y HPLC analítica. Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con DMDI de inicio reciente (< 6 meses desde el diagnóstico) y controles sanos que expresan las moléculas de HLA DR4 apropiadas se separaron por centrifugación en gradiente de densidad y se co-cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo en U con péptidos a una concentración de 10 μ g/ml durante 5 días en 150 μ l de RPMI 1640/10% de suero AB normal combinado, seguido de pulsos con 0,5 μ Ci de [3 H]-timidina / pocillo y recolectando sobre filtros para recuento de radiactividad media en cuentas por minuto (cpm). Había doce pocillos replicados por grupo de ensayo. Los resultados se expresaron como un índice de estimulación (IE) que es la relación de las cpm obtenidas a partir de cultivos que contienen péptido con las cpm obtenidas a partir de cultivos sin péptido (cpm medias de 12 pocillos en cada caso).
- 45 Los datos también se analizaron en términos de la fracción de "pocillos de cultivo positivos". Un pocillo de cultivo positivo fue uno que contenía péptido y resultó en $\text{cpm} > \text{cpm medias} + 2\text{SD}$ obtenidas a partir de cultivos sin péptido. Las respuestas de linfocitos T se consideraron significativas cuando el IE es $> 2,0$ y > 40 % de los pocillos son positivos

Ensayo de unión:

- 50 Los péptidos sintéticos con secuencias de aminoácidos basados en las 6 regiones centrales identificadas mediante IMF se analizaron para determinar su capacidad para unirse a moléculas de HLA-DR4 aisladas en un ensayo de inhibición de la unión realizado esencialmente como se ha descrito anteriormente [Chicz y col.(1997), J. Immunol. 159: 4935 - 4942]. En breve, alícuotas de la preparación inmunopurificada de HLA-DR4 (concentración final de 10 μ g / ml) se incubaron con un péptido de unión a HLA-DR4 biotinilado (que consiste en los residuos 98-117 de la cadena invariable del MHC de clase II) ("el péptido indicador") (1 μ M) y concentraciones variables de los péptidos de ensayo en tubos de 0,2 ml. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, los contenidos de cada tubo se transfirieron a un pocillo de una placa de microtitulación de plástico de 96 pocillos previamente recubierta con el anticuerpo anti-HLA-DR4. Las placas de microtitulación se sacudieron durante 60 minutos a temperatura ambiente y el material no unido se eliminó por lavado riguroso. La cantidad relativa de péptido estándar

unido en cada pocillo se determinó midiendo el desarrollo de color después de la adición de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, lavando y añadiendo un sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina.

Ejemplo 1. Análisis de los péptidos de unión a HLA DR4 derivados mediante procesamiento natural de IA-2iC por linfocitos B

Para establecer si el SLA descrito conduce a la generación de péptidos (unidos a moléculas de HLA de clase II en la superficie) similares a los producidos por las CPA tras la captación natural de un polipéptido parental, se generó una línea de linfocitos T CD4+ específica del toxoide del tétanos (TT). Las células NG2 mostraron altos niveles similares de [³H] -timidina cuando se cocultivaron con CPA en las que la TT biotinilada había sido dirigida a los orgánulos de procesamiento de antígeno usando el SLA descrito (cpm medias = 7750 después de 3 días de cultivo) que cuando se cultivaron con CPA y TT normales (cpm medias= 8427). El valor de fondo obtenida usando CPA sin TT fue de 2528 cpm. Después de realizar el SLA, las alícuotas de las células de Priess se incubaron a 37 °C durante 0, 1, 3, o 6 horas y después se ensayaron para determinar la presencia de TT en sus superficies mediante tratamiento secuencial con antisuero anti-TT de conejo ("anti-TT") e Ig anti-conejo de cabra conjugado con FITC ("FARIG"), seguido de análisis de citometría de flujo (Fig. 1). En comparación con las muestras iniciales tratadas con FARIG y no anti-TT (-), la expresión en superficie de TT fue alta a las 0 horas (●●●●), había disminuido a 1 (- ● -) y 3 (- - -) horas, y estaba completamente ausente a las 6 horas (●●●). Este experimento demostró que las proteínas liberadas través del SLA se internalizan rápidamente y se dirigen a la vía de procesamiento de antígeno DE HLA de clase II, y que los epítomos peptídicos relevantes se presentan a los linfocitos T CD4 + respondedores.

El autoantígeno del islote IA-2iC fue objetivo sobre la superficie de linfocitos B transformados con EBV de Priess utilizando el sistema de liberación de antígeno (SLA) descrito anteriormente. En la primera etapa, se incubaron 5-10 x 10⁷ células B transformadas con EBV de Priess con b-PWM. Después de eliminar mediante lavado el b-PWM no unido, se añadió avidina a la suspensión celular para proporcionar un puente entre el b-PWM y el b-IA-2iC.

Después de proporcionar pulsos de IA-2iC biotinilado, las células se incubaron durante 1-6 horas a 37 °C para permitir la internalización, el procesamiento y la presentación. Una población control de células se pulsó con b-PWM y avidina solamente. Las moléculas de HLA-DR4 (0401) se purificaron en cada sedimento celular, los péptidos unidos se eluyeron y se separaron mediante RP-HPLC, y cada una de 100 fracciones se analizó mediante MALDI-TOF. El análisis RP-HPLC fue altamente reproducible, mostrando las trazas cromatográficas de las preparaciones de IA-2iC pulsadas y de HLA-DR4 control un índice de similitud de 96 a 99 %. Se utilizó un enfoque de sustracción para identificar los péptidos derivados de IA-2iC. Los espectros de masas de las fracciones de RP-HPLC equivalentes a partir de preparaciones IA-2iC pulsadas y control biotiniladas se superpusieron y las masas comunes a ambos se descontaron de su posterior análisis. Un ejemplo de tal perfil se muestra en la Fig. 2. Los espectros de masas para el repertorio péptido HLA-DR4 (0401) aislado de células Priess pulsadas con IA-2iC se compararon con los espectros para el repertorio peptídico aislado de células Priess de control para identificar nuevos valores de m / z (relación masa a carga) correspondientes a los péptidos derivados de IA-2iC (Fig. 2). En la Fig. 2, mientras que los picos con valores de m / z de aproximadamente 1747 y 1822 se observaron en los espectros obtenidos con mezclas de péptidos a partir de células Priess tanto pulsadas con IA-2iC como control, los picos con valores m / z de 1779,75 y 1935,8 solo se vieron en el espectro obtenido con la mezcla de péptidos a partir de las células Priess pulsadas con IA-2iC.

El experimento se realizó por triplicado. De los valores de aproximadamente 3000 m / z observados, se identificaron inicialmente 85 nuevas masas como posibles péptidos procesados de forma natural a partir de IA-2iC. Los análisis de masas posteriores utilizando una mayor resolución y una exactitud de masa más estricta reveló que 24 valores de m / z tenían masas correspondientes a los péptidos sintéticos candidatos derivados de IA-2iC. Estos péptidos sintéticos se sometieron al análisis de espectrometría de masas. La identificación de masas fue altamente reproducible, identificándose las mismas 24 masas en tres preparaciones de células B separadas y 3 separaciones mediante RP-HPLC separadas. Las mismas masas se observaron cuando se permitió que las células B de internalizaran, procesaran y presentarán antígeno durante 1 hora y 6 horas, aunque la mejor la carga peptídica de moléculas de DR4 se vio a la hora. Las secuencias de las masas se muestran en la Tabla 1. Cada una de las secuencias era miembro de uno de los 6 conjuntos anidados de péptidos. Los conjuntos anidados son grupos de péptidos basados alrededor de la misma región central, pero truncada de forma variable o extendida en los extremos N y C. Las 6 regiones centrales contenían aminoácidos que se sabe que se prefieren para la unión de HLA-DR4 (0401). Las secuencias de los péptidos con SEC ID N° 10, SEC ID N° 13, y SEC ID N° 25 se han confirmado utilizando la metodología CAD descrita anteriormente aplicada a muestras de del material relevante separado con MALDI-TOF. También se han obtenido secuencias parciales correspondientes a varios péptidos de cada una de las regiones centrales descritas anteriormente.

Tabla 1. Masas de péptidos derivados de IA-2 observadas y calculadas experimentalmente eluidas de HLA-DR4 (0401)

m/z observado	m/z calculado	Restos	Correspondiente secuencia IA-21a	Péptido sintético usado en el ensayo de células T primario
1469,31	1468,65	657 - 671	VSSQFSDAQAASPSS (SBQ ID N° 1)	654 - 674 VSSVSSQFSDAQAASPSSHSS (SEC ID N° 18)
1469,31	1468,65	656 - 670	SVSSQFSDAQAASPS (SEC ID N° 2)	
1469,31	1468,65	655 - 669	SSVSSQFSDAQAASP (SEC ID N° 3)	
1866,76	1866,80	656 - 674	SVSSQFSDAQAASPSSHSS (SEC ID N° 4)	
2397,16	2397,08	652 - 675	SRVSSVSSQFSDAQAASPSSHST (SEC ID N° 5)	
2441,48	2441,02	656 - 679	SVSSQFSDAQAASPSSHSTPSWC (SEC ID N° 6)	
2485,29	2483,03	657 - 680	VSSQFSDAQAASPSSHSTPSWCE (SEC ID N° 7)	
1367,44	1367,57	718 - 730	AYQAEPTCATAQ (SEC ID N° 17)	709 - 732 LAKKWQALCAYQABPNTCATAQGE (SEC ID N° 22)
1640,86	1640,68	716 - 731	LCAYQAEPTCATAQG (SRO ID NO:18)	
1935,92	1935,91	709 - 725	LAKEWQALCAYQAEPT (SEC ID N° 19)	
1965,83	1965,88	718 - 736	AYQAEPTCATAQGEQNIK (SEC ID N° 20)	
1968,75	1968,84	713 - 730	WQALCAYQAEPTCATAQ (SEC ID N° 21)	
1489,64	1489,15	802 - 815	GCTVIVMLTPLVED (SEC ID N° 23)	797 - 817 NVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (SEC ID N° 32)
1489,64	1489,75	803 - 816	CTVIVMLTPLVEDG (SEC ID N° 24)	
1762,88	1762,85	800 - 816	ESGCTVIVMLTPLVEDG (SEC ID N° 25)	
1779,85	1780,19	797 - 812	MVWESGCTVIVMLTPL (SEC ID N° 26)	
1861,16	1860,97	801 - 818	SGCTVIVMLTPLVEDGVK (SEC ID N° 27)	
1861,16	1860,97	800 - 817	ESGCTVIVMLTPLVRDGV (SEQ ID NO:28)	
1883,44	1882,88	795 - 810	WQMVWESGCTVIVMLT (SEC ID N° 29)	
2144,95	2144,97	793 - 810	DFWQMVWESGCTVIVMLT (SEC ID N° 30)	
2341,17	2339,15	794 - 813	FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (SEC ID N° 31)	
1508,65	1508,74	861 - 872	TQETRILTQFHF (SEC ID N° 9)	854 - 872 FYLKNVQTQETRILTQFHF (SEC ID N° 16)
1539,34	1593,85	855 - 867	YLKNVQTQETRILT (SEC ID N° 10)	
1735,78	1735,87	859 - 872	VQTQETRILTQFHF (SEC ID N° 11)	

Tabla 1 (continuación)

1806,79	1806,96	856 - 870	LKNVQTQETRTL TQP (SEC ID N° 12)	
1822,41	1822,96	855 - 869	YLNKVNQTQETRTL TQ. (SEC ID N° 13)	
1831,87	1830,94	851 - 871	KNVQTQETRTL TQFH (SEC ID N° 14)	
2341,17	2341,19	853 - 871	SFYLNKVNQTQSTRTL TQFH (SEC ID N° 15)	
1469,31	1469,67	957 - 969	DQFEFALTAVAAEE (SEC ID N° 33)	955 - 975
1866,76	1866,90	957 - 973	DQFEFALTAVAAEVNAI (SEC ID N° 34)	SKDQFEFALTAVAAEVNAILK
1935,49	1936,04	959 - 976	FEFALTAVAAEVNAILKA (SEC ID N° 35)	(SEC ID N° 37)
1968,75	1968,95	955 - 972	SKDQFEFALTAVAAEVNA (SEC ID N° 36)	
1367,44	1367,67	754 - 765	KVESPSPSRSDYI (SEC ID N° 38)	753 - 771
1367,44	1367,67	753 - 764	LKYESPSPSRSDY (SEC ID N° 39)	LKVESPSPSRSOYINASP II
1880,98	1880,96	752 - 768	KLKVESPSPSRSDYINAS (SEC ID N° 40)	(SEC ID N° 42)
2441,48	2441,19	754 - 775	KVESPSPSRSDYINASPIISHDP (SEC ID N° 41)	
			LKVESPSPSRSDYINASP II (SEC ID N° 42)	

- Seis péptidos sintéticos con secuencias de aminoácidos basados en las 6 regiones centrales de IA-2iC se utilizaron para examinar las respuestas de linfocitos T de sangre periférica en pacientes con DMDI (que expresan y que no expresan HLA-DR4) y en sujetos control sanos que expresan HLA-DR4 (Tabla 2). De 13 pacientes de DMDI con HLA-DR4, 9 tenían linfocitos T que mostraron respuestas proliferativas ("POS" en la Tabla 2) significativas a al menos uno de los 6 péptidos. Once de los pacientes con DR4 expresaron el alelo 0401 y dos expresaron tanto el alelo 0403 como el 0405 alelos. Los genes 0401, 0403, y 0405 codifican cadenas DRβ similares, que solo difieren en las posiciones 57 (0405 S para D), 71 (0403 y 0405 R para K), 74 (0403 E para A) y 86 (0403 V para G) [Marsh, S.G., Tissue Antigens 51:467 - 507, (1998)]. Los motivos de unión peptídica de estos tipos de HLA-DR4 se conocen y son similares, y se ha predicho que todos se unen a las 6 regiones de péptidos centrales IA-2iC. Los linfocitos T de solo 1/8 pacientes de DMDI no-DR4 proliferaron cuando se expusieron a cualquiera de los péptidos, y ninguno de los de los sujetos control (todos 0401) respondió a ninguno de los péptidos. Los péptidos de las 6 de las 6 regiones centrales provocaron respuestas de linfocitos T y los linfocitos T de la mayoría de los pacientes respondedores proliferaron frente a un único péptido.
- En conjunto*, estos datos indican que el procedimiento IMF aplicado al análisis de los péptidos producidos por el procesamiento natural del IA-2iC tuvo como resultado la caracterización de péptidos que son reconocidos por linfocitos T CD4 + específicamente de pacientes de DMDI que expresan HLA DR4 y, por lo tanto, pueden estar implicados en el proceso de la enfermedad DMDI. Este hallazgo representa un avance significativo en el conocimiento sobre la etiología de la DMDI y proporciona la base para el desarrollo de agentes terapéuticos y / o profilácticos para la DMDI, por ejemplo, APL. Cabe esperar que metodologías análogas puedan tener igualmente éxito en la identificación de péptidos implicados en la patogenia de otras enfermedades mediadas por los linfocitos T CD4 + (véase anteriormente) en las que la susceptibilidad está vinculada a la expresión de una molécula del MHC de clase II concreta.

Tabla 2. Respuestas de las células T de pacientes con DMID y sujetos de control a los péptidos 1A-2 eluidos

Caso	Edad (años)	Duración (semanas)	Genotipo <i>DRB1</i>	Autoanticuerpos IA-2	Respuesta de linfocitos T al péptido IA-2				
					654 - 674	709 - 732	955 - 975	797 - 817	854 - 872
HLA-DR4									
Pacientes de DMDI									
S(G)	17	8	0401, 0101	+				POS	
G(G)	26	12	0401, 1302	+	POS				
K(G)	28	28	0401, 1101	+	POS				
ML	29	3	0401, 0403	-					POS
EW(B)	29	16	0401/0401	+				POS	
RW(B)	20	4	0401/0401	+	POS				
TH(B)	19	4	0401/0301	-			POS		
DC(I)	6	4	0403, 0405	+		POS			
GR	13	<1	0403, 0405	+	POS			POS	POS
NC(B)	36	16	0401/0404	+					
HW	15	12	0401/0401						
LG(G)	16	4	0401, 0301	+					
RM	24	1	0401, 1302						
Pacientes de DMDI									
(no-DR4)									
ID	28	4	0102, 0301	-	POS			POS	POS
PQ	20	25	0301	-					
MI	16	12	1201, 1301	+					
ML(I)	10	12	0101, 1101	-					
ST (I)	13	2	0301, 1301	+					

[illegible]

Ejemplo 2. Unión de péptidos de consenso a moléculas de HLA-DR4 aisladas

Con el fin de probar la capacidad de los 6 péptidos consenso que representan las 6 regiones centrales definidas por el IMF descrito en el Ejemplo 1, se realizó un ensayo de inhibición de la unión (Fig. 3). R1 era el péptido que consiste en los residuos 797 a 817 de IA-2; R2 era el péptido que consiste en los restos 854 a 872 de IA-2; R3 era el péptido que consiste en los restos 753 a 771 de IA-2; R4 era el péptido que consiste en los restos 654 a 674 de IA-2; R5 era el péptido que consiste en los restos 709 a 732 de IA-2; R6 era el péptido que consiste en los restos 955 a 975 de IA-2; y li-c fue el mismo que el péptido indicador (es decir, un péptido que consiste en los restos 98-117 de la cadena invariable del MCH de clase II). Los datos presentados en la Fig. 3 indican que: R4 y R5 se unen fuertemente a las moléculas de HLA-DR4; li-c, R1 y R6 se unen con avidez intermedia; y R2 y R3 se unen débilmente. Estos resultados confirman que, como se predijo mediante los procedimientos IMF y VE descritos en el Ejemplo, los seis péptidos consenso (R1, R2, R3 y R4-R6) todos se unen a moléculas DR4. Por lo tanto, este tipo de ensayo de unión u otros conocidos en la técnica (por ejemplo, la unión directa en lugar de los ensayos de inhibición de la unión) se puede utilizar como procedimientos de VE adicionales o sustitutos al descrito en el ejemplo 1.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a la realización actualmente preferida, debe entenderse que pueden realizarse diversas modificaciones sin desviarse de la invención. De acuerdo con lo anterior, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones siguientes.

Realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención son las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que se une a HLA-DR4, que consiste en la secuencia de aminoácidos:

- (1) YLKNVQTQETRRTL (SEC ID N° 10);
 (2) YLKNVQTQETRRTLQ (SEC ID N° 13); o
 (3) FYLKNVQTQETRRTLQFHF (SEC ID N° 16).

2. El péptido aislado de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos YLKNVQTQETRRTL (SEC ID N° 10).

3. El péptido aislado de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos YLKNVQTQETRRTLQ (SEC ID N° 13).

4. El péptido aislado de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos FYLKNVQTQETRRTLQFHF (SEC ID N° 16).

5. Un péptido aislado que se une a HLA-DR4, que consiste en la secuencia de aminoácidos:

- (1) AYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 17);
 (2) LAKEWQALCAYQAEPNT (SEC ID N° 19);
 (3) AYQAEPNTCATAQGEGNIK (SEC ID N° 20);
 (4) WQALCAYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 21); o
 (5) LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (SEC ID N° 22).

6. El péptido aislado de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos AYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 17).

7. El péptido aislado de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos LAKEWQALCAYQAEPNT (SEC ID N° 19).

8. El péptido aislado de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos AYQAEPNTCATAQGEGNIK (SEC ID N° 20).

9. El péptido aislado de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos WQALCAYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 21).

10. El péptido aislado de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (SEC ID N° 22).

11. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos KLKVESSPSRSDYINAS (SEC ID N° 40).

12. Un procedimiento de diagnóstico de la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) que comprende:

- (a) proporcionar linfocitos CD4 de un individuo sospechoso de tener, o que es susceptibles a tener, DMDI;
 (b) proporcionar una población de CPA que llevan en su superficie una molécula del MHC de clase II de un alelo idéntico a uno expresado por dicho individuo, habiéndose puesto en contacto la población de APC con un péptido IA-2 y estando la molécula del MHC de clase II unida al péptido IA-2;
 (c) poner en contacto la población de CPA de (b) con los linfocitos CD4 de (a); y
 (d) determinar si los linfocitos CD4 reconocen el péptido unido al MHC de clase II, como una indicación de que el individuo tiene, o es susceptible de tener, DMDI,

en el que dicho péptido IA-2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- YLKNVQTQETRRTL (SEC ID N° 10); YLKNVQTQETRRTLQ (SEC ID N° 13); FYLKNVQTQETRRTLQFHF (SEC ID N° 16); AYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 17); LAKEWQALCAYQAEPNT (SEC ID N° 19); AYQAEPNTCATAQGEGNIK (SEC ID N° 20); WQALCAYQAEPNTCATAQ (SEC ID N° 21); LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (SEC ID N° 22); y KLKVESSPSRSDYINAS (SEC ID N° 40).

13. El aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la protección de un sujeto frente a la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) o a los síntomas patogénicos de la DMDI.

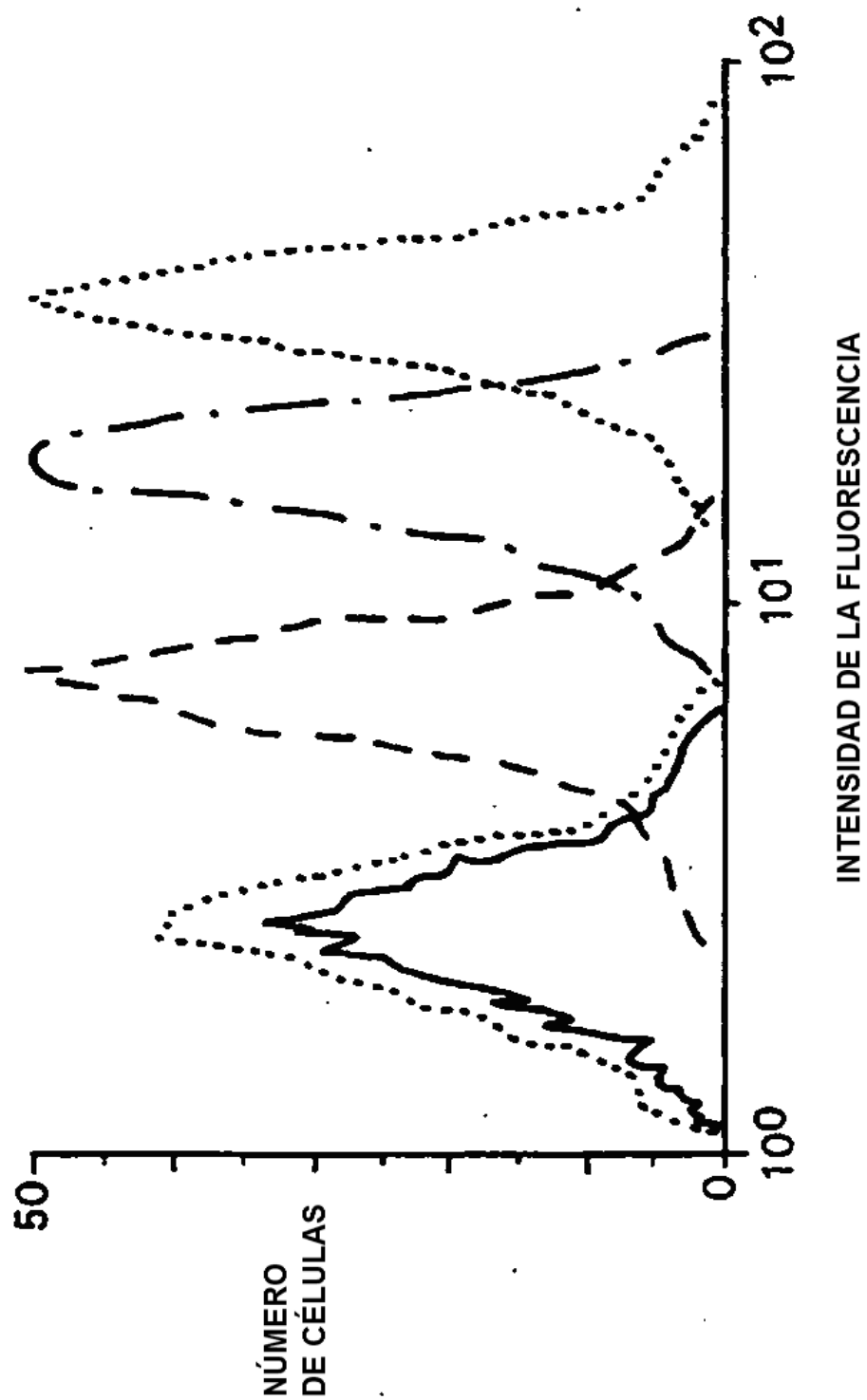


FIG. 1

